
**Endozytose, Retrotranslokation und Ubiquitinierung
des viralen K28-Toxins der Hefe
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Dipl. Biol. Susanne Heiligenstein

Saarbrücken 2008

Tag des Kolloquiums: 13.06.2008

Dekan: Prof. Dr. Uli Müller

Prüfungsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. Jörn Walter

Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt, Prof. Dr. Friedrich Giffhorn

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Andreas Bichet

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas,
in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein (1879-1955)

Für meine Tochter, meine Mutter und meine Großmutter

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Heiligenstein, S.; Eisfeld, K.; Sendzig, T.; Jimenéz-Becker, N.; Breinig, F.; Schmitt, M.J. (2006): Retro-Translocation of a virally encoded yeast α/β -toxin from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *EMBO J.* 25(20):4717-27.

Leis, S.; Spindler, J.; Reiter, J.; Breinig, F.; Schmitt, M.J. (2004): *S. cerevisiae* K28 toxin - a secreted virus toxin of the A/B family of protein toxins In: Schmitt, M. J. & Schaffrath, R. (eds): *Microbial Protein Toxins. Topics in Current Genetics Vol. 11*, Springer, 111-132

Leis, S.; Reiter, J.; Sendzig, T.; Schmitt, M.J. (2004): Virale Killertoxine der Hefe – Wirkung auf Zellzyklus und DNA-Synthese. *BIOspektrum* 4/04 - 10. Jahrgang, 387-388

Leis, S.; Eisfeld, K.; Schmitt, M.J. (2003): Receptor-mediated endocytosis, retrograde transport and ER dislocation of the yeast K28 virus toxin. *Yeast*, 20, S1, S239

Schmitt, M.J.; Eisfeld, K.; Leis, S. (2002): "Intelligente" Strategien zur Abtötung eukaryonter Zielzellen : Die Rolle mikrobieller A/B-Toxine. *BIOforum Forschung Entwicklung*, 25. Jahrgang, 7-8, 487-489

Eisfeld, K.; Leis, S.; Schmitt, M.J. (2001): Ubiquitination and ER-to-cytosol export of the α/β heterodimeric K28 toxin in yeast. *Yeast*, 18, S1, S354

Abkürzungsverzeichnis

5´-FOA	5-Fluoroorotic Acid
A1PiZ	α 1-Antitrypsin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	„anaphasen promoting complex“
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Cap	Capsid
Cap/Pol	Capsid/RNA-abhängige RNA-Polymerase
CPY	Carboxypeptidase der Hefe
CPY*	mutierte Carboxypeptidase Y
C-Terminus	Carboxyterminus von Proteinen
DAPI	4´,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
d/o	„drop out“
dsRNA	doppelsträngig RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
FITC	„fluorescein isothiocyanate“
FLB	„formamide loading buffer“
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GLB	„gel loading buffer“
GTE	Glucose-Tris-EDTA
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	„Luria Bertani Broth“

LY	„Lucifer Yellow“
MBA	Methylenblauagar
MCS	„multiple cloning side“
MIPS	„munich information center for protein sequences“
NBT	4-Nitro-blau-tetrazolium-chlorid
N-Terminus	Aminoterminus von Proteinen
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p α F	Pro- α -Faktor
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	Pyrococcus furiosus
pptox	Präprotoxin
PVDF	„polyvinylidene difluoride“
RNase	Ribonuklease
SC	„Synthetic Complete“
SDS	Natruimdodecylsulfat
SOE	„Splicing by overlapping extension“ PCR
SNARE	SNAP („soluble NSF attachment protein“) Rezeptor
t-SNARE	„target“ SNARE
v-SNARE	„vesicle“-SNARE
ss	„single stranded“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA-Bindeprotein
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht

UV	Ultraviolett
VLP	„virus-like particle“
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
YEPD	„yeast extract / peptone / dextrose“
YNB	„Yeast nitrogen base“

Kurzdarstellung

K28-Killerstämme der Hefe *S. cerevisiae* sezernieren ein nicht-glykosyliertes Protein-Toxin, das über Endozytose und retrograden Transport durch den Sekretionsweg in sensitive Hefen eindringt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass es sich bei dem sekundären Membranrezeptor des K28-Toxins um den HDEL-Rezeptor Erd2p handelt. Als Endozytosesignal fungiert, neben der NPF-Sequenz im Plasmamembranrezeptor Erd2p, auch eine Markierung durch Ubiquitin, die durch das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc4p und die Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p erfolgt.

Es wird dargestellt, dass die Aufnahme des viralen K28-Toxins durch einen Clathrin- und Aktin-vermittelten Prozess unter Beteiligung des AP2-Komplexes erfolgt.

Desweiteren wird demonstriert, dass die Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p essentiell für den Toxin-Export aus dem ER in das Zytosol einer sensitiven Zelle ist. An der Retrotranslokation beteiligt sind ebenfalls die ER-luminalen Chaperone Scj1p und Jem1p. Der Transport des K28-Toxins aus dem ER ist ebenso abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration im Sekretionsweg der Hefe. Eine Beteiligung des Cdc48/Ufd4p/Npl1p-Komplexes und des Proteasoms am Export von K28 aus dem ER in das Zytosol kann ausgeschlossen werden. Eine komplett Lysin-freie Toxinvariante wies eine unveränderte *in-vivo*-Abtötungs-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Toxin auf. Die Retrotranslokation des K28-Toxins erfolgt deshalb unabhängig von einer Ubiquitinierung.

Abstract

K28 killer strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* secrete a non-glycosylated protein toxin that traverses sensitive yeast cells by endocytosis and retrograde transport through the secretory pathway.

Here it is demonstrated that the secondary membrane receptor of K28 toxin has very recently been identified as the HDEL receptor Erd2p. Within the sequence of the plasma membrane receptor Erd2p, the motive NPF acts as an endocytosis signal, as well as an ubiquitination mediated by the ubiquitin-conjugation enzyme Ubc4p and the ubiquitin-protein-ligase Rsp5p.

It is shown that the endocytosis of the virally encoded K28 toxin is based on a clathrin- and actin-mediated process in cooperation with the AP2 complex. Within this thesis the function of the protein disulfid isomerase is shown to be essential for the export of K28 from the ER to the cytosol of a sensitive yeast cell. In addition, the ER luminal chaperones Scj1p and Jem1p play an important role in toxin retrotranslocation. The transport of K28 out of the ER is also dependent on the Ca^{2+} -concentration in the secretory pathway of a yeast cell.

An involvement of the Cdc48/Ufd4p/Npl1p complex and the proteasom in retrotranslocation of K28 can be excluded. A toxin variant in which all four lysin residues had been converted to arginine showed almost identical *in vivo* killing activity as the wild-type toxin. Retrotranslocation of the K28 toxin is therefore independent of ubiquitination.

1 Einleitung	7
1.1 Das Killerphänomen der Hefe	7
1.2 Struktur und Prozessierung des Killertoxins K28	9
1.3 Aufnahme, Wirkung und Immunität des Toxins	10
1.4 Proteintoxine und ihre Wirkungsweisen	13
1.5 Ziele und Fragestellungen der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Organismen	19
2.2 Plasmide	26
2.3 Oligonukleotide	28
2.4 Nährmedien	31
2.5 Puffer und Lösungen	35
2.5.1 Standard-Puffer	35
2.5.2 Puffer zu Bindungstests und Aufnahmestudien von K28-Toxin	36
2.5.3 Puffer zur alkalischen Lyse	37
2.5.4 Puffer zur Isolierung chromosomaler DNA	37
2.5.5 Puffer zur Agarosegelelektrophorese	38
2.5.6 Puffer zur LiAc-Transformation	39
2.5.7 Puffer zur SDS-PAGE	39
2.5.8 Puffer zum Western-Blot	40
2.5.9 Puffer zur Zellyse und Zellfraktionierung von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.5.10 Puffer zur Immunpräzipitation	42
2.5.11 Puffer zur Immunfluoreszenz	42
2.6 Kulturbedingungen	43
2.7 Zellzahlbestimmung	43
2.7.1 Gesamtzellzahl	43
2.7.2 Bestimmung der Zelldichte	44

2.8	Produktion von K28-Killertoxinkonzentrat	44
2.8.1	Ultrafiltration	44
2.8.2	Sterilfiltration	45
2.9	Methylenblau-Agar-Diffusionstest (MBA-Test)	45
2.9.1	Killertest	45
2.9.2	Test auf Resistenz/Sensitivität	45
2.10	Eichung der Toxinkonzentration im Agardiffusionstest	46
2.11	Bindungstests von K28-Toxin an sphäroplastierten Hefezellen	47
2.11.1	Sphäroplastierung	47
2.11.2	Bindungsstudien	47
2.12	Untersuchung zur Aufnahme von K28-Toxin an intakten Zellen	48
2.13	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	48
2.13.1	Alkalische Lyse	48
2.13.2	Plasmidisolierung mittels PEQLAB Plasmid-Miniprep Kit	49
2.14	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	50
2.15	DNA-Reinheits und -Konzentrationsbestimmung	51
2.16	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.16.1	SOE-PCR	52
2.16.2	Oligonukleotide	52
2.17	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
2.18	Agarose-Gelelektrophorese	53
2.19	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	54
2.20	Ligation	54
2.21	TOPO [®] -Klonierung von PCR-Produkten und Sequenzierung	55
2.21.1	TOPO-Klonierung	55
2.21.2	Sequenzierung von PCR-Produkten	55

2.22	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	55
2.23	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> nach der LiAc-Methode	56
2.24	Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation von <i>S. cerevisiae</i>	57
2.24.1	Sphäroplastierung	57
2.24.2	Inkubation der sphäroplastierten Hefen mit K28-Killertoxinkonzentrat	58
2.24.3	Zellfraktionierung	58
2.25	Protein-Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
2.26	Western-Blot-Analyse	59
2.26.1	„Semi-dry-blotting“	59
2.26.2	Immundetektion	60
2.27	Immunpräzipitation	62
2.27.1	Vorbereitung der Proben	62
2.27.2	Immunpräzipitation	62
2.28	Mikroskopie	62
2.28.1	Indirekte Immunfluoreszenz	63
2.28.2	Primäre und sekundäre Antikörper zur Fluoreszenzmikroskopie	65
2.28.3	Fluoreszenzmikroskopie	65
2.28.4	Differentieller Interferenz-Kontrast (NORMARSKI)	65
2.29	Chemikalien, Enzyme und Kits	66
2.29.1	Restriktionsendonukleasen	66
2.29.2	Chemikalien	66
2.29.3	Molekularbiologische Standards und Kits	67
3	Ergebnisse	68
3.1	Untersuchungen zur endozytotischen Aufnahme und zum intrazellulären Transport des K28-Toxins in sensitiven Hefezellen	68
3.1.1	Differentielle Zentrifugation und Nachweis der Organellenspezifischen Verteilung durch Markerproteine	68
3.1.2	Untersuchungen zur Identifizierung des HDEL-Rezeptors Erd2p als Plasmamembranrezeptor des viralen K28-Toxins	70

3.1.3	Untersuchungen zur Internalisierung des K28-Toxins durch sensitive Hefezellen	86
3.1.4	Untersuchungen zur endozytotischen Toxin-Aufnahme und zum intrazellulären K28-Transport durch Screening von Deletionsmutanten	89
3.2	Untersuchungen zur ER-Zytosol-Translokation des K28-Toxins	104
3.2.1	Untersuchungen zum Einfluss der ER-Chaperone Scj1p und Jem1p auf den Export von K28 in das Zytosol sensitiver Hefen	104
3.2.2	Subzelluläre Lokalisation von K28-Toxin in einer $\Delta scj1\Delta jem1$ Doppelmutante	105
3.2.3	Einfluss der Protein-Disulfid-Isomerase auf den ER-Zytosol-Transport des K28-Toxins	106
3.2.4	Subzelluläre Fraktionierung zur Untersuchung des Einflusses von PDI auf die ER-Zytosol-Translokation	108
3.2.5	Untersuchungen der Oxidase-Mutanten Ero1p auf Toxinsensitivität	109
3.2.6	Einfluss der PDI-Isomerase-Aktivität auf die K28-Wirkung	111
3.2.7	Einfluß zytosolischer Chaperone auf die Toxin-Retrotranslokation	112
3.3	Untersuchungen zur K28-Ubiquitinierung und zum Einfluss der Ubiquitinierung auf den Toxintransport	115
3.3.1	Subzelluläre Lokalisation von K28 in einer Toxin-behandelten $\Delta ubc4$ Mutante	115
3.3.2	Vergleichende Studien zur Toxin-Aufnahme in einer $\Delta ubc4$ Deletionsmutante	117
3.3.3	Konstruktion eines Hefevektors zur konstitutiven Expression eines Ubc4 ^{GFP} -Fusionsproteins	118
3.3.4	Nachweis der Funktionalität des Ubc4 ^{GFP} -Fusionsproteins durch Komplementation einer $\Delta ubc4$ Deletionsmutante	119
3.3.5	Intrazelluläre Lokalisation des Ubc4 ^{GFP} -Fusionsproteins	120
3.3.6	Toxinsensitivität einer temperatursensitiven Hefemutante mit Defekt in der Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p	122

3.3.7	Subzelluläre Lokalisationsstudien zum Nachweis von K28 in einer toxinbehandelten <i>rsp5-1</i> Mutante	123
3.3.8	Kinetik der Toxinaufnahme einer <i>rsp5-1</i> Mutante	124
3.3.9	Einfluss der WW-Domänen von Rsp5p auf die Toxinsensitivität	125
3.3.10	Phänotypische Charakterisierung einer Deletionsmutante mit Defekt im deubiquitinierenden Enzym Doa4p	126
3.3.11	Einfluss der Ubiquitin-Verknüpfung auf die Toxinresistenz einer Δ <i>doa4</i> Mutante	127
3.3.12	Einfluss des Proteasoms auf die Toxinwirkung	129
3.3.13	Konstruktion eines Hefevektors zur konstitutiven Expression einer Toxinvariante ohne Lysinrest in der β -Untereinheit	130
3.3.14	Konstruktion eines Hefevektors zur konstitutiven Expression von Wildtyp K28-Toxin	131
3.3.15	Produktion von K28-K294R-Toxinkonzentrat	132
3.3.16	Vergleichende Expression und Toxizität der Konstrukte K28 und K294R	132
3.3.17	Untersuchungen zur Stabilität von Wildtyp-Toxin und mutiertem Toxin (K294R) im Zytosol toxinbehandelter Zellen	134
3.3.18	Untersuchungen zur Ubiquitinierung von Wildtyp-Toxin und einer Lysin-freien Variante (K28-K0) im Zytosol toxinbehandelter Hefezellen	135
4	Diskussion	137
4.1	Die Endozytose des K28-Toxins	138
4.1.1	Der HDEL-Rezeptor Erd2p ist der Plasmamembran-Rezeptor des viralen K28-Toxins	140
4.1.2	Erd2p besitzt das Endozytosesignal NPF	146
4.1.3	Die Ubiquitinierung durch die Enzyme Ubc4p und Rsp5p regulieren die Endozytose von K28	148
4.1.4	Die Endozytose von K28 ist abhängig von Clathrin und dem AP2-R-Komplex	153
4.1.5	Das Aktin-Zytoskelett beeinflusst die Aufnahme von K28	158
4.1.6	Nur ein Teil des K28-Toxins gelangt über Endosomen zum Golgi	164

4.1.7	Ein Großteil des Toxins wird in der Vakuole abgebaut	167
4.1.8	Die Doa4p Ubiquitin Isopeptidase deubiquitiniert den K28-Membranrezeptor	171
4.1.9	Eine Monoubiquitinierung des K28-Membranrezeptors reicht für die Endozytose aus	172
4.2	Der retrograde Toxintransport	174
4.2.1	DnaJ Chaperone sind essentiell für den ER-Export von K28	175
4.2.2	Änderungen der Ca ²⁺ -Homöostase im Sekretionsweg verhindern die Ausbildung der K28-Toxizität	176
4.2.3	Die Protein-Disulfid-Isomerase sorgt für die ER-Retrotranslokations-Kompetenz des Toxins	177
4.2.4	Lysin-freies Toxin transloziert aus dem ER und ist toxisch	181
4.3	Modell der Toxinwirkung	184
5 Zusammenfassung		186
6 Summary		188
7 Literatur		190
8 Anhang		213
Erklärung		242
Danksagung		243
Lebenslauf		244

1 Einleitung

1.1 Das Killerphänomen der Hefe

Als einzige Viren sind doppelsträngige RNA Viren in der Lage, die Zellen aller Organismen zu befallen (Prasad *et al.*, 1996). Bei der Hefe wurde dieser Typ Virus erstmals über den von ihm verursachten Phänotyp entdeckt. Bevan und Makower (1963) beschrieben als Erste Killerstämme der Hefe *S. cerevisiae*, die in der Lage waren, sensitive Hefestämme derselben und verwandter Arten abzutöten. Die Annahme, die Killereigenschaft sei auf ein chromosomal kodiertes Killertoxin zurückzuführen, konnte nach einfachen Kreuzungsversuchen von Killerhefen mit Nichtkillerhefen ausgeschlossen werden (Bevan and Makover, 1963; Woods and Bevan, 1968). Daraufhin wurden dsRNA-Elemente als Ursache des Killerphänomens entdeckt, die einer zytoplasmatischen Vererbung unterliegen (Bevan *et al.*, 1973). Dies gab den Anstoß zur Erforschung der Hefevirologie in den späten 60er und frühen 70er Jahren (Bevan *et al.*, 1973; Somers and Bevan, 1969). Davon ausgehend wurden Killereigenschaften auch bei den Hefegattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metchnikovia*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis* und *Zygosaccharomyces* beschrieben (Bussey and Skipper, 1975; Golubev and Shabalin, 1994; Gunge, 1986; Hodgson *et al.*, 1995; Kagayama *et al.*, 1988; Magliani *et al.*, 1997; Schmitt and Neuhausen, 1994; Schmitt *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1990). Die genetische Basis des Killercharakters kann dabei variieren. Zum einen kann die genetische Information der Toxine wie bei *S. cerevisiae* durch im Zytosol persistierende dsRNA-Viren kodiert sein, zum anderen auf linearen Plasmiden (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae*) oder im Genom (*Pichia anomala*, *Williopsis mrakii*) selber vorliegen (Schmitt and Breinig, 2002). Alle Killerhefen produzieren und sezernieren Proteine oder Glykoproteine, welche auf sensitive Hefen letal wirken, gegen die sie selbst allerdings immun sind (Magliani *et al.*, 1997; Schmitt and Breinig, 2002). Die ökologische Rolle der Toxine liegt darin, Killerhefen in ihrem natürlichen Habitat einen Wachstumsvorteil gegenüber ihren mikrobiellen Konkurrenten

einzuräumen, um so die optimale Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten (Magliani *et al.*, 1997). Diese antagonistischen Beziehungen konnten intensiv innerhalb von Hefegemeinschaften auf sich zersetzenden Früchten beobachtet werden, die sich durch eine hohe Zuckerkonzentration und einen niedrigen pH-Wert auszeichnen, welche optimale Voraussetzungen zur Produktion und Aktivität der Killertoxine darstellen (Czaran and Hoekstra, 2003; Starmer *et al.*, 1987; Young and Yagiu, 1978). Killertoxin produzierende Hefen sind aufgrund ihrer Eigenschaften von besonderem Interesse in der Industrie, wo sie als Starterkulturen in Fermentationsprozessen ihren Einsatz finden. Sie vermeiden Kontaminationen mit nicht erwünschten Hefen und schützen insbesondere bei der Weinherstellung das Endprodukt vor weiterer Fermentation (Van Vuuren and Jacobs, 1992).

Von besonderem Interesse für die Humanmedizin ist das therapeutische Potenzial von Killertoxinen der Stämme *Williopsis californica* und *Pichia anomala*, die in der Lage sind, pathogene Pilze wie *Candida albicans* oder *Pneumocystis carinii* abzutöten (Seguy *et al.*, 1998; Theisen *et al.*, 2000). Jedoch weisen die meisten hefeeigenen Toxine eine zytotoxische Aktivität auf, die auf einen engen pH-Bereich und Temperaturen zwischen 20°C und 30°C beschränkt ist, was eine kutane Applikation favorisieren würde.

Ferner leistet die Erforschung der Killertoxine einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Sekretion und Prozessierung extrazellulärer Proteine in eukaryontischen Systemen. So wurden in den letzten Jahren Sekretionssignale der aus Hefe stammenden Invertase, der sauren Phosphatase oder des Killertoxins aus *Kluyveromyces lactis* genutzt, um in Hefestämmen heterolog medizinisch oder pharmazeutisch interessante, sekretorische Proteine zu exprimieren (Braspenning *et al.*, 1998; Broker *et al.*, 1987; Clare *et al.*, 1991; Paifer *et al.*, 1994). Ebenfalls zeigte sich, dass das Sekretions- und Prozessierungssignal des *S. cerevisiae* ScV-M28 Killervirus volle Funktionalität in den Hefestämmen *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* zeigt und mit hoher Effizienz genutzt werden kann, um Fremdproteine zur Sekretion ins

extrazelluläre Medium zu bringen (Eiden-Plach *et al.*, 2004; Heintel *et al.*, 2001).

1.2 Struktur und Prozessierung des Killertoxins K28

Die von den Satellitenviren M₁, M₂ und M₂₈ kodierten Killertoxine K1, K2 und K28 werden im Zytoplasma der Hefe als höhermolekulare Präprotoxine synthetisiert. K1, K2 und K28 weisen weder Sequenzhomologien untereinander noch zu anderen bekannten Proteinen auf. Auf ihrem intrazellulären Sekretionsweg durch das Lumen von ER und Golgi werden die Toxine posttranslational prozessiert und modifiziert, um in einem späten Golgi-Kompartiment die biologisch aktive Form des Proteins anzunehmen.

Das komplette Präprotoxin von K28 besteht aus 345 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 38 kDa. Das Präprotoxin setzt sich aus einer N-terminalen hydrophoben Signal-Sequenz, einer α - und einer β -Untereinheit (10,5 kDa und 11 kDa) sowie einer potentiell N-glykosylierten γ -Sequenz, die α und β voneinander trennt, zusammen. Durch die hydrophobe Signal-Sequenz wird das Vorläufertoxin in das Lumen des ER geschleust, wo es zunächst zu einem höhermolekularen Protoxin glykosyliert und anschließend im Golgi durch die Kex2p-Protease prozessiert wird. Die von dem *KEX2*-Gen der Hefe kodierte Kex2p-Endopeptidase spaltet bevorzugt sekretorische Proteine am C-Terminus dibasischer Aminosäurepaare (Lys-Arg, Arg-Arg) (Tao *et al.*, 1990). Im Falle von K28 wird durch die Wirkung der Kex2p-Protease die N-glykosylierte γ -Sequenz entfernt. Die dadurch freigesetzten basischen Aminosäuren an den C-Termini der α - und β -Untereinheiten werden durch die Kex1p-Carboxypeptidase abgespalten. Das biologisch aktive Protein wird schließlich als 21 kDa α/β -Heterodimer sekretiert, dessen Untereinheiten durch eine einzelne Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten Cys⁵⁶ (α) und Cys³⁴⁰ (β) kovalent miteinander verknüpft sind (Riffer *et al.*, 2002). Mutationen im *KEX2*-Gen führen in K1-, K2- und K28-Killerhefen zu einem Nichtkillerphänotyp, da die Killertoxine nicht mehr prozessiert und daher auch nicht mehr sezerniert werden (Riffer *et al.*,

2002). Mutationen in *Kex1* führen ebenfalls zu einem Nichtkiller-Phänotyp, ohne jedoch die Sekretionseffizienz zu beeinflussen (Eisfeld *et al.*, 2000).

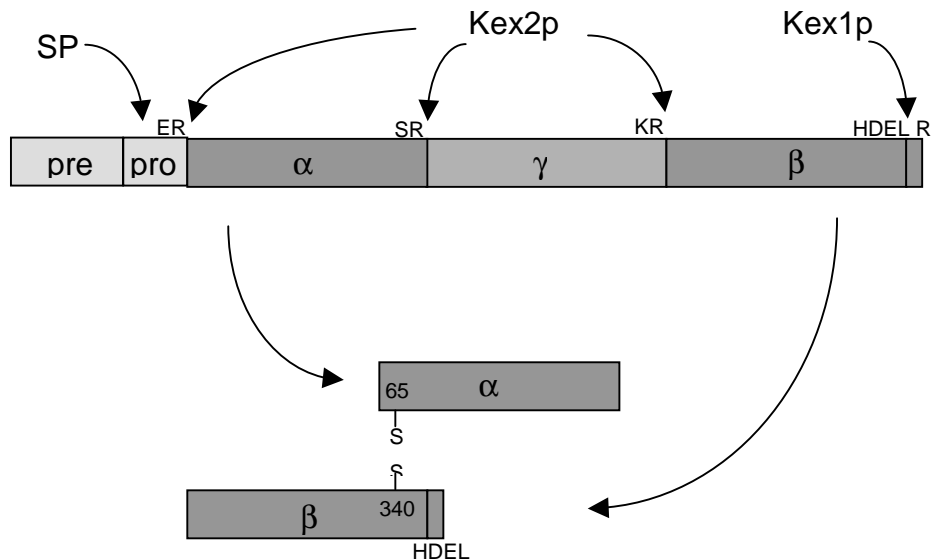


Abbildung 1: Domänenstruktur des K28-Präprotoxins und Prozessierung zum biologisch aktiven Toxin (nach Riffer *et al.*, 2002)

1.3 Aufnahme, Wirkung und Immunität des Toxins

Die Killertoxine K1, K2 und K28 töten sensitive Hefezellen über einen zweistufigen rezeptorvermittelten Mechanismus ab. K1 und K2 entfalten ihre toxische Wirkung, indem sie als Ionophore wirken, während K28 zu einem Zellzyklusarrest und zu einer irreversiblen Hemmung der DNA-Synthese führt (Schmitt *et al.*, 1996).

Auf Zellwandebene bindet das reife K28-Heterodimer an ein hochmolekulares α -1,3-Mannoprotein, welches als Primärrezeptor fungiert. Dort reichert sich das Toxin an, bis es schließlich in einem zweiten energieabhängigen Schritt an einen bislang noch nicht eindeutig bestimmten Sekundärrezeptor in der Plasmamembran bindet und wahrscheinlich mit

diesem internalisiert wird. Eisfeld konnte für das K28-Toxin erstmals zeigen, dass es über Endozytose in eine sensitive Zielzelle gelangt (Eisfeld, 2001). Mit Hilfe der an der frühen Endozytose beteiligten Proteine End3p und End4p gelangt das Toxin über Vesikel zum Golgi-Apparat, wo es den rückläufigen Sekretionsweg durchläuft und schließlich das Zytoplasma der Zelle erreicht. Das reife Killertoxin trägt an seinem β -C-Terminus eine HDEL-Sequenz, die als klassisches ER-Retentionssignal bekannt ist und normalerweise an den C-Termini ER-residenter Proteine vorkommt (Pelham *et al.*, 1988; Pelham *et al.*, 1992). Durch diese Signalsequenz wird das K28-Toxin vom frühen Golgi-Kompartiment durch den membrangebundenen HDEL-Rezeptor Erd2p in das ER geschleust (Pelham, 1990; Semenza *et al.*, 1990), von wo es durch das Sec61-Translokon, dem Haupt-Import- und Exportkanal des ER, in das Zytoplasma exportiert wird. Hierbei benutzt das Toxin einen Weg, der ansonsten nur von fehlgefalteten Proteinen eingeschlagen wird, die im ER erkannt werden und über das Translokon ins Zytoplasma gelangen, um dort am Proteasom abgebaut zu werden (Ellgaard and Helenius, 2003; Tsai *et al.*, 2002). K28 scheint ebenfalls in der Lage, Komponenten dieses ERAD-Weges (ER-associated protein degradation) zu nutzen (Heiligenstein *et al.*, 2006).

Im Zytosol der Zelle wird die β -Untereinheit des Toxins ubiquitiniert und abgebaut, was eine Freisetzung der α -Untereinheit zur Folge hat. Diese Freisetzung könnte auch aufgrund der reduzierenden Bedingungen im Zytosol und der daraus resultierenden Spaltung der Disulfidbrücke des Toxins erfolgen. Jedoch ist eine hohe Konzentration des Toxin-Dimers im Zytosol nachweisbar, was auf eine hohe Stabilität der Disulfidbrücke zurückgeführt werden kann (Eisfeld, 2001). Dass die α -Untereinheit die alleinige toxische Komponente des K28-Toxins darstellt, konnte durch die induzierte intrazelluläre Expression verschiedener α -Derivate nachgewiesen werden, die alle zur Abtötung der entsprechenden exprimierenden Hefen führten (Sendzig, 2003).

Die K28- α -Untereinheit gelangt über passive Diffusion durch den Kernporenkomplex in den Zellkern, wo eine Wechselwirkung mit dem TATA-Bindeprotein (TBP) und Apc2p, einem Bestandteil des APC („anaphase

promoting complex“), nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion der α -Untereinheit mit TBP führt zu einer Inhibierung der Transkription der G1-Cykline (Cln1p, Cln2p), welches die allgemeine Transkription allerdings unbeeinträchtigt lässt. Die Interaktion mit Apc2p führt zur Hemmung des APC, der für den Zellzyklus-spezifischen Abbau von B-Typ-Zyklinen verantwortlich ist, und damit zu einer Stabilisierung der B-Typ-Zykline. Beide gemeinsam, Transkriptions-Inhibierung und APC-Hemmung, führen vermutlich zum terminalen K28-Phänotyp, dem Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase und dem DNA-Synthesestopp (Reiter, 2004).

Als weiteren toxischen Effekt zeigt die Behandlung von sensitiven Hefezellen mit K28-Toxin in subletalen Konzentrationen die Ausbildung apoptotischer Marker wie DNA-Fragmentierung, Phosphatidylserin-Translokation, Zellschrumpfung und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Reiter *et al.*, 2005).

Da das reife Toxin ebenfalls von toxinproduzierenden Zellen wiederaufgenommen wird, stellt sich die Frage, auf welcher Ebene sich die Immunität dieser Toxinproduzenten etabliert. Eisfeld (2001) konnte zeigen, dass in K28-Produzenten im Zytosol sowohl das Präprotoxin als auch das reife Toxin vorhanden sind. Folglich ist die Immunität nicht abhängig von einem Block in der Aufnahme des reifen Toxins in die Zelle. Die Konzentration des wiederaufgenommenen Toxins konnte durch die Steigerung an exogenem Toxin erhöht werden (Eisfeld, 2001). Das Auftreten des Präprotoxins in großen Mengen im Zytosol Toxin-produzierender Zellen, lässt darauf schliessen, dass der Toxinvorläufer eher posttranslational als cotranslational in den Sekretionsweg eingeschleust wird. Bei einem Austausch der K28-Signalsequenz gegen die K1-Signalsequenz, die einen cotranslationalen ER-Import bedingt, wurde keine Immunität mehr vermittelt. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Präprotoxin zusammen mit dem reifen Toxin im Zytosol in der Lage ist, einen Komplex zu bilden. Die Bildung dieses Komplexes bewirkt vermutlich, dass das reife Heterodimer im Zytosol die α -Untereinheit als seine toxische Komponente freisetzen kann. Um einen konstanten Level an Präprotoxin in der Zelle erhalten zu können, wird vermutlich das reife Heterodimer im

Komplex ubiquitiniert und abgebaut. Das Präprotoxin kann daraufhin erneut mit einem K28-Molekül interagieren oder aber den Sekretionsweg beschreiten und selber zum reifen Toxin werden (Breinig, *et al.*, 2006).

1.4 Proteintoxine und ihre Wirkungsweisen

Viele Prokaryonten, Tiere und Pflanzen produzieren Toxine, die ihre toxische Wirkung gegen andere lebende Organismen richten. Es wird angenommen, dass die Toxine die Überlebenschance, das Wachstum und die Verbreitung eines speziellen Organismus in einer speziellen Umgebung sichern. Natürliche Toxine sind das Produkt einer Co-Evolution von Spezies, die sich eine ökologische Nische teilen, und sind deshalb in der Hinsicht modifiziert und angepasst, ein spezielles, molekulares Ziel des Wirtes oder der Beute zu treffen. Die Toxine haben im Laufe der Evolution „gelernt“, welches die essenziellen vitalen Prozesse in einem Organismus sind und wie sie am effektivsten selektiv die Schlüsselmoleküle dieser Prozesse ausschalten können. Die somit in der Natur vorhandenen unterschiedlichen Toxine lassen sich nach der sie bildenden Spezies, nach ihrem Aufbau oder ihrer Wirkungsweise in unterschiedliche Gruppen zusammenfassen.

Alle tierische Toxine sind gegen Zelloberflächenproteine gerichtet, die wiederum an essenziellen Funktionen der Zelle beteiligt sind. Fast alle Ziele dieser Proteine sind Ionenkanäle, die durch die Bindung der Toxine inaktiviert werden und in Verbindung mit neuronalen oder muskulären Funktionen stehen. Diese Strategie wird deshalb verfolgt, da Tiere das von ihnen gebildete Gift benutzen, um die Beute oder den Feind zu immobilisieren. Eine Blockierung der Synapsen führt genau zu diesem gewünschten Erfolg. Um diesen Effekt so schnell wie möglich erzielen zu können, liegen die „Targets“ dieser Toxine an der Oberfläche (siehe (Rappuoli and Montecucco, 1997))

Bakterielle und pflanzliche Toxine brauchen diesen extremen Effekt der Schnelligkeit der Toxinwirkung nicht. Sie sind vielmehr in der Lage, eine Vielfalt an differenzierten Strategien zu entwickeln, um die Physiologie des

Wirtes oder des Konkurrenten zu modifizieren und ihr eigenes Wachstum und ihre Ausbreitung voranzubringen.

Eine große Gruppe bakterieller Toxine zerstört die Plasmamembranaktivität, indem sie die Membranpermeabilität verändert. Enzymatische Membranschädigungen treten auf durch sekretierte Lipasen wie die Phospholipase A oder C von *Bacillus subtilis* bzw. *Bacillus cereus*. Diese führen zu einem Abbau der Phospholipide in der Plasmamembran, was deren Zerstörung zur Folge hat und zur anschließenden Lyse der angegriffenen Zelle führt. Eine weitere Strategie zur Zerstörung der Membranpermeabilität wird durch die Bildung von Poren in der Membran erreicht. Beispiele für Porenbildner sind das Aerolysin von *Aeromonas spp.* oder das α -Hämolysin von *Escherichia coli*. Diese Toxine bauen sich in die Membran ein und bewirken durch die Bildung einer Pore einen Ionenausstrom, welcher letztendlich zu einer Zerstörung des Protonengradienten und zur Zelllyse führt (Fivaz *et al.*, 2001).

Fast alle verbleibenden bakteriellen Proteintoxine agieren innerhalb der Zielzelle. Diese Toxine bestehen in der Regel aus zwei unterschiedlichen Anteilen: ein Teil, die sogenannte B-Untereinheit, ist für die Bindung an und das Eindringen in die Zelle verantwortlich. Die A-Untereinheit birgt die enzymatische Aktivität und ist für die eigentliche toxische Wirkung innerhalb der Zelle zuständig. Keines dieser Toxine transferiert in eine Ziellzelle direkt über die Plasmamembran; sie nutzen vielmehr vorhandene endozytotische Wege, die für die Aufnahme von Liganden, Rezeptoren und Nahrungsstoffen zur Verfügung stehen. Sie werden in das Lumen intrazellulärer Kompartimente aufgenommen und erreichen ihre Toxizität, sobald die A-Untereinheit freigesetzt und über eine Membran in das Zytosol der Zielzelle transportiert wird. Dabei benutzen die verschiedenen AB-Toxine unterschiedliche zelluläre „Routen“ in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Rezeptoren, an die sie binden, und von dem Zelltyp, gegen den sie gerichtet sind. Die AB-Toxine werden aufgrund ihrer Struktur in zwei Untergruppen aufgeteilt. So besteht bei der ersten Gruppe die B-Untereinheit aus einer oder zwei Domänen; die zweite Gruppe besitzt eine B-Domäne, die aus fünf Untereinheiten aufgebaut ist (Falnes and Sandvig, 2000; Sandvig

and van Deurs, 2002; Schiavo and van der Goot, 2001). Die erste Gruppe der AB-Toxine erreicht meistens das Zytosol der Zelle über ein azidisches zelluläres Kompartiment. Es gibt Hinweise darauf, dass ein niedriger pH-Wert eine Konformationsänderung innerhalb des Toxins hervorruft, die dazu führt, dass sich das Toxin in die Lipiddoppelschicht einbaut und den Transfer der katalytischen A-Domäne ins Zytosol vermittelt (Barth *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2001; Collier, 2001). Die zweite Gruppe der AB-Toxine benötigt keinen niedrigen pH-Wert, um das Zytosol zu erreichen; es gibt eher Hinweise darauf, dass die Reduktion der einzigen Disulfidbrücke, die die A-Untereinheit mit dem B-Oligomer verbindet, ausreicht, um den A-Teil des Toxins translokationskompetent zu machen (Majoul *et al.*, 1996; Sandvig and van Deurs, 1996). Im Zytosol angelangt, können diese Toxine eine Reihe von essenziellen Zellabläufen stören. Einige Toxine attackieren verschiedene Komponenten der Proteinsynthese, andere stören die Aktin-Polymerisation. Eine weitere Gruppe der AB₅-Toxine hat sich auf die Manipulation von G-Proteinen spezialisiert, die verschiedene Signaltransduktionen steuern. Weitere Toxine erhöhen aktiv den cAMP-Gehalt in der Zelle. Andere Toxine dieser Gruppe beeinträchtigen das Immunsystem oder greifen verschiedene Stellen des vesikulären Transportsystems an (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Proteintoxine, ihre Struktur und enzymatische Aktivität

(geändert nach (Sandvig and van Deurs, 2002))

Toxin	Produzent	Toxinstruktur	Aktivität	Zielprotein
Membranschädigende Toxine				
Porenbildung				
Aerolysin	<i>Aeromonas ssp.</i>	Polypeptidkette Monomer	Porenbildung	
α -Hämolysin	<i>Escherichia coli</i>	Polypeptidkette Monomer	Porenbildung	
enzymatische Membranschädigung				
Phospholipase A	<i>Bacillus subtilis</i>	Polypeptidkette Monomer	Lipase	Phospho- lipide
β -Hämolysin	<i>Clostridium perfringens</i>	Polypeptidkette Monomer	Sphingo- myelinase	Sphingo- myelin
Internalisierte Toxine				
Beeinträchtigung der Signaltransduktion				
Cholera Toxin	<i>Vibrio cholerae</i>	AB ₅ -KDEL	ADP-ribosyl- Transferase	G-Protein
Enterotoxin	<i>Escherichia coli</i>	AB ₅ -KDEL	ADP-ribosyl- Transferase	G-Protein
Pertussis Toxin	<i>Bordetella pertussis</i>	AB ₅	ADP-ribosyl- Transferase	G-Protein
Beeinträchtigung der Proteinsynthese				
Shiga-Toxin	<i>Shigella dysenteriae</i>	AB ₅	N-Glycosylase	28S rRNA
Diphtherie Toxin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	AB	ADP-ribosyl- Transferase	EF-2
Exotoxin A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB-REDLK	ADP-ribosyl- Transferase	EF-2
Ricin	<i>Ricinus communis</i>	AB	N-Glycosylase	28S rRNA
Beeinträchtigung des Zytoskeletts				
C2,3-Toxin	<i>Chlostridium botulinium</i>	AB	ADP-ribosyl- Transferase	G Aktin
Beeinträchtigung des Membrantransports				
VacA	<i>Helicobacter pylori</i>	AB	Vakuolenbildung	
Tetanus Neurotoxin	<i>Clostridium tetani</i>	AB	Zink-Endoprotease	VAMP
Beeinträchtigung der Immunantwort				
Anthrax-Toxin	<i>Bacillus anthracis</i>	AB	Überexpression von Cytokinen	Makro- phagen

Zwischen dem K28-Toxin der Hefe *S. cerevisiae* und den bakteriellen AB-Toxinen bestehen große Homologien in der Toxinstruktur, der Toxinaufnahme, im Transport durch die Zelle und in der eigentlichen Toxinwirkung. Die Untereinheiten α und β von K28 sind ebenfalls durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und eine Aufgabenteilung der einzelnen Untereinheiten in Bindung und Transport (β -Untereinheit) auf der einen Seite und toxischer Wirkung (α -Untereinheit) auf der anderen ist auch bei diesem Toxin zu erkennen. Wie die AB-Toxine wird K28 über einen Plasmamembranrezeptor endozytotisch in die Zelle aufgenommen und durchläuft den retrograden Sekretionsweg aufgrund eines spezifischen ER-Retentionssignals am β -C-Terminus (HDEL). Dieser Weg, und damit das Vorhandensein des HDEL-Rezeptors im Golgi, wird analog von bestimmten bakteriellen Toxinen genutzt. In Säugerzellen steht hierfür der KDEL-Rezeptor zur Verfügung; die entsprechenden KDEL-Sequenzen (oder deren Variationen) sind in der A-Untereinheit des Cholera-Toxins, des Enterotoxins (LT1) und des Exotoxins A (RDELK) enthalten (siehe Tabelle 1). In der Toxinwirkung haben die AB-Toxine mit K28 gemeinsam, dass sie ebenfalls den Zelltod durch mehrere Mechanismen auslösen können (Sandvig and van Deurs, 2002). Die Toxine Ricin und Shiga-Toxin nehmen Einfluss auf die Proteinbiosynthese und sind wie K28 in der Lage, Apoptose in der Zielzelle auszulösen (Baluna *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2001).

1.5 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen drei Themenkomplexe bearbeitet, die die Toxinaufnahme, den Toxintransport und die Rolle der Ubiquitinierung im Wirkungsmechanismus des K28-Toxins auf molekularer Ebene behandeln.

Der erste Teil befasst sich mit der endozytotischen Aufnahme des Toxins. Hauptschwerpunkt lag hierbei in der Identifizierung des Plasmamembranrezeptors von K28. Hierzu sollten die Ergebnisse von Spindler (2004) bezüglich der Rolle von Erd2p verifiziert und insbesondere der Erd2p-Rezeptor an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Um genauere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Endozytose des K28-Toxins zu erhalten, wurde ein Screen von Deletionsmutanten durchgeführt, in dem nach K28-resistenten bzw. -hypersensitiven Mutanten gesucht wurde.

Der zweite Teil behandelt den Toxintransport aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der Zielzelle. Hier sollte geklärt werden, welche Proteine an der ER-Translokation beteiligt sind.

Schließlich sollte im letzten Teil die Rolle der Ubiquitinierung an der Toxinwirkung analysiert werden. Hier sollte der Einfluss der Ubiquitinierung des Toxins auf dessen Transfer aus dem ER ins Zytosol untersucht werden. Ein weiterer Punkt, der adressiert werden sollte und sich erst im Rahmen dieser Arbeit ergab, war der Effekt der Ubiquitinierung auf die endozytotische Aufnahme des K28-Toxins.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme, deren Eigenschaften und Herkunft sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Stämme der Hefe *S. cerevisiae*
(relevante Gendelektionen sind im Fettdruck dargestellt)

Stamm	Genotyp	Referenz
SEY6210	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2 suc2</i>	Nishikawa <i>et al.</i> , 2001
Δ YA12	<i>MATα ade2 ade3 his3-Δ200 leu2-3,-112 ura3-52 TRP1 erd2-ΔNco mit Plasmid pYA12 (2μ URA3 ADE3 SEC12)</i>	H. Pelham
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf, OpenBiosystems
YBL040c	<i>MATα/MATα his3-Δ1/his3Δ1 leu2-Δ0/leu2Δ0 lys2-Δ0/LYS2 MET15/met15-Δ0 ura3-Δ0/ura3-Δ0 YBL040c::kanMX4/YBL040c</i>	Euroscarf
RH448	<i>MATα his4 leu2 ura3 lys2 bar1</i>	Raths <i>et al.</i> , 1993
RH1623	<i>MATα ura3 leu2 his4 bar1 ts end3</i>	Raths <i>et al.</i> , 1993
192.2d	<i>MATα ura3 leu2</i>	Schmitt <i>et al.</i> , 199)
SNY1025	<i>MATα Δscj1::TRP1 ura3 leu2 trp1 his3 lys2 suc2</i>	Nishikawa <i>et al.</i> , 2001
SNY1028	<i>MATα Δjem1::LEU2 ura3 leu2 trp1 his3 lys2 suc2</i>	Nishikawa <i>et al.</i> , 2001
SNY1026-7A	<i>MATα Δjem1::LEU2 Δscj1::TRP1 ura3 leu2 trp1 his3 lys2 suc2</i>	Nishikawa <i>et al.</i> , 2001
W303	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3</i>	Kurjan, 1985
M4492	<i>MATα pdi1::HIS3 Δpcr1 Δeng1 Δmpd1 Δmpd2::G418 ura3 trp1 his3 pBH1800 [MPD1 CEN TRP1]</i>	Norgaard <i>et al.</i> , 2001

Stamm	Genotyp	Referenz
M4560	<i>MATα ts ero1-1 ura3 leu2 trp1 his3</i>	Frand and Kaiser, 1998
M4130	<i>pdi1::His3</i> <i>ade2-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15</i> <i>pCT37[<i>PDI1</i> unter Gal-Promotor, URA3]</i>	Holst et al., 1997
WPY106	<i>Mata, ura3-52, leu2-3, cdc48-3</i>	Ye et al., 2003
BWG 1-7a	<i>Mat a, his4-519, ura3-52, ade1-100, leu2-3,-112</i>	Ye et al., 2003
PM373	<i>Mat a, his4-519, ura3-52, ade1-100, leu2-3,-11, ufd1-1</i>	Ye et al., 2003
S288C	<i>Mata, ura3-52, leu2Δ1, trp1Δ63</i>	Ye et al., 2003
PSY2340	<i>Mata, ura3-52, leu2Δ1, trp1Δ63 npl4-1</i>	Ye et al., 2003
PSY2341	<i>Mata, ura3-52, leu2Δ1, trp1Δ63 npl4-2</i>	Ye et al., 2003
JN55	<i>MATα leu2-3, 112, his 3-11, ura3-52, trp1Δ1, lys2</i>	Becker et al., 1996
a1-45 Δ U	<i>MAT α, leu2-3, 112, his3-11, ura3-52, trp1Δ1, lys2, ssa1-45 ts, ssa2::LEU2, ssa3::TRP1, ssa4::LYS2</i> Nonpermissive temperature: 37°C	Becker et al., 1996
JN212	<i>MAT a, ura3-52, leu2-3, 112, his3-11,15, lys2, trp1Δ1, Δssb1, Δssb2</i>	Becker et al., 1996
YW01	<i>Mata, prc1-1, trp1-1, his3Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3-112</i>	Wolfgang Seufert
YWO13	<i>Mata, prc1-1, trp1-1, his3Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3-112 ubc4::His3</i>	Wolfgang Seufert
LHY291	<i>MATa his3 trp1 lys2 ura3 leu2 bar1</i>	Dunn and Hicke, 2001
LHY23	<i>Mata ura3 leu2 trp1 bar1 rsp5-1</i>	Dunn and Hicke, 2001
LHY434	<i>MATa his3 lys2 trp1 ura3 rsp5Δ::HIS3 leu2::RSP5::LEU2 bar1Δ::HIS3</i>	Dunn and Hicke, 2001
LHY433	<i>MATa his3 lys2 trp1 ura3 rsp5Δ::HIS3 leu2::rsp5-2::LEU2 bar1Δ::HIS3</i>	Dunn and Hicke, 2001

Stamm	Genotyp	Referenz
LHY1654	<i>MATa Δrsp5::HIS3 leu2 ura3 his3 trp1 bar1 GAL pRSP5 [TRP1]</i>	Dunn and Hicke, 2001
LHY1729	<i>MATa Δrsp5::HIS3 leu2 ura3 his3 trp1 bar1 GAL pRSP5-WW1 [TRP1]</i>	Dunn and Hicke, 2001
LH1735	<i>MATa Δrsp5::HIS3 leu2 ura3 his3 trp1 bar1 GAL pRSP5-WW3 [TRP1]</i>	Dunn and Hicke, 2001
MHY501	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3,112, ura3-52, lys2-801, trp1-1</i>	Amerik <i>et al.</i> , 2000
MHY623	<i>MATα, his3-Δ200, leu2-3,112, ura3-52, lys2-801, trp1-1, doa4-Δ1::LEU2</i>	Amerik <i>et al.</i> , 2000
WCG4	<i>MATa, his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993
Pre1-1	<i>MATa, his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pre1-1</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993
Pre2-2	<i>MATa, his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pre2-2</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993

Tabelle3: Auflistung verwendeter Hefen mit Deletionen in Endozytose - relevanten Genen (ausgehend vom *S. cerevisiae* Wildtypstamm BY4742, Openbiosystems)

	ORF	deletiertes Gen
1	YAL002w	<i>VPS8</i>
2	YAL005c	<i>SSA1</i>
3	YAL007c	<i>ERP2</i>
4	YAL014c	<i>SYN8</i>
5	YAL026c	<i>DRS2</i>
6	YAL029c	<i>MYO4</i>
7	YAL030w	<i>SNC1</i>
8	YAL042w	<i>ERV46</i>
9	YAL048c	-
10	YAR002c-a	<i>ERP1</i>
11	YBL007c	<i>SLA1</i>
12	YBL017c	<i>PEP1</i>
13	YBL047c	<i>EDE1</i>
14	YBL063w	<i>KIP1</i>
15	YBL078c	<i>AUT7</i>
16	YBL099w	<i>ATP1</i>
17	YBL106c	<i>SRO77</i>
18	YBR021w	<i>FUR4</i>
19	YBR039w	<i>ATP3</i>
20	YBR068c	<i>BAP2</i>
21	YBR069c	<i>TAT1</i>
22	YBR097w	<i>VPS15</i>
23	YBR105c	<i>VID24</i>
24	YBR127c	<i>VMA2</i>
25	YBR131w	<i>Ccz1</i>
26	YBR162w-a	<i>YSY6</i>
27	YBR164c	<i>ARL1</i>
28	YBR169c	<i>SSE2</i>
29	YBR170c	<i>NPL4</i>
30	YBR171w	<i>SEC66</i>
31	YBR172c	<i>SMY2</i>
32	YBR217w	<i>APG12</i>
33	YBR264c	<i>YPT10</i>
34	YBR283c	<i>SSH1</i>
35	YBR286w	<i>APE3</i>
36	YBR288c	<i>APM3</i>
37	YBR294w	<i>SUL1</i>
38	YBR298c	<i>MAL31</i>
39	YCL008c	<i>STP22</i>
40	YCL038c	<i>AUT4</i>
41	YCL040w	<i>GLK1</i>

	ORF	deletiertes Gen
42	YCR009c	<i>RVS161</i>
43	YCR032w	<i>BPH1</i>
44	YCR067c	<i>SED4</i>
45	YCR075c	<i>ERS1</i>
46	YDL018c	<i>ERP3</i>
47	YDL077c	<i>VAM6</i>
48	YDL107w	<i>MSS2</i>
49	YDL128w	<i>VCX1</i>
50	YDL137w	<i>ARF2</i>
51	YDL161w	<i>ENT1</i>
52	YDL185w	<i>TFP1</i>
53	YDL192w	<i>ARF1</i>
54	YDL194w	<i>SNF3</i>
55	YDL198c	<i>YHM1</i>
56	YDL210w	<i>UGA4</i>
57	YDL226c	<i>GCS1</i>
58	YDR027c	<i>VPS54</i>
59	YDR046c	<i>BAP3</i>
60	YDR057w	<i>YOS9</i>
61	YDR108w	<i>GSG1</i>
62	YDR117c	-
63	YDR129c	<i>SAC6</i>
64	YDR136c	<i>VPS61</i>
65	YDR139c	<i>RUB1</i>
66	YDR142c	<i>PEX7</i>
67	YDR153c	<i>ENT5</i>
68	YDR229w	<i>IVY1</i>
69	YDR298c	<i>ATP5</i>
70	YDR320c	<i>SWA2</i>
71	YDR323c	<i>PEP7</i>
72	YDR335w	<i>MSN5</i>
73	YDR345c	<i>HXT3</i>
74	YDR372c	<i>VPS74</i>
75	YDR384c	<i>ATO3</i>
76	YDR388w	<i>RVS167</i>
77	YDR395w	<i>SXM1</i>
78	YDR400W	<i>URH1</i>
79	YDR424c	<i>DYN2</i>
80	YDR432w	<i>NPL3</i>
81	YDR456w	<i>NHX1</i>
82	YDR470c	<i>UGO1</i>

	ORF	deletiertes Gen
83	YDR481c	<i>PHO8</i>
84	YDR484w	<i>VPS52</i>
85	YDR488c	<i>PAC11</i>
86	YDR490c	<i>PKH1</i>
87	YDR497c	<i>ITR1</i>
88	YDR508c	<i>GNP1</i>
89	YEL006w	-
90	YEL027w	<i>CUP5</i>
91	YEL031w	<i>SPF1</i>
92	YEL051w	<i>VMA8</i>
93	YEL060c	<i>Prb1</i>
94	YEL061c	<i>CIN8</i>
95	YEL063c	<i>CAN1</i>
96	YER017c	<i>AFG3</i>
97	YER019c-a	<i>SBH2</i>
98	YER031c	<i>YPT31</i>
99	YER039c	<i>HVG1</i>
100	YER053c	-
101	YER056c	<i>FCY2</i>
102	YER110c	<i>KAP123</i>
103	YER119c	<i>AVT6</i>
104	YER144c	<i>UBP5</i>
105	YFL011w	<i>HXT10</i>
106	YFL025c	<i>BST1</i>
107	YFL026w	<i>STE2</i>
108	YFL041w	<i>FET5</i>
109	YFL050c	<i>ALR2</i>
110	YFR019w	<i>FAB1</i>
111	YFR045w	-
112	YGL002w	<i>ERP6</i>
113	YGL005c	<i>COG7</i>
114	YGL006w	<i>PMC1</i>
115	YGL016w	<i>KAP122</i>
116	YGL051w	<i>MST27</i>
117	YGL054c	<i>ERV14</i>
118	YGL077c	<i>HNM1</i>
119	YGL095c	<i>VPS45</i>
120	YGL104c	<i>VPS73</i>
121	YGL114w	-
122	YGL156w	<i>AMS1</i>
123	YGL167c	<i>PMR1</i>
124	YGL180w	<i>APG1</i>
125	YGL200c	<i>EMP24</i>
126	YGL206c	<i>CHC1</i>
127	YGL210w	<i>YPT32</i>
128	YGL212w	<i>VAM7</i>

	ORF	deletiertes Gen
129	YGL212w	<i>VAM7</i>
130	YGL216w	<i>KIP3</i>
131	YGL223c	<i>COG1</i>
132	YGR020c	<i>VMA7</i>
133	YGR055w	<i>MUP1</i>
134	YGR057c	<i>LST7</i>
135	YGR121c	<i>MEP1</i>
136	YGR131w	-
137	YGR166w	<i>KRE11</i>
138	YGR167w	<i>CLC1</i>
139	YGR241c	<i>YAP1802</i>
140	YGR261c	<i>APL6</i>
141	YHL002w	<i>HSE1</i>
142	YHL019c	<i>APM2</i>
143	YHL031c	<i>GOS1</i>
144	YHL036w	<i>MUP3</i>
145	YHR012w	<i>VPS29</i>
146	YHR028c	<i>DAP2</i>
147	YHR043c	<i>DOG2</i>
148	YHR050w	<i>SMF2</i>
149	YHR064c	<i>SSZ1</i>
150	YHR092c	<i>HXT4</i>
151	YHR094c	<i>HXT1</i>
152	YHR108w	<i>GGA2</i>
153	YHR110w	<i>ERP5</i>
154	YHR123w	<i>EPT1</i>
155	YHR127w	<i>HSN1</i>
156	YHR129c	<i>ARP1</i>
157	YHR135c	<i>Yck1</i>
158	YHR142w	<i>CHS7</i>
159	YHR161c	<i>YAP1801</i>
160	YHR195w	<i>NVJ1</i>
161	YIL005w	<i>EPS1</i>
162	YIL030c	<i>SSM4/</i>
163	YIL076w	<i>SEC28</i>
164	YIL170w	<i>HXT12</i>
165	YIR004w	<i>DJP1</i>
166	YIR028w	<i>DAL4</i>
167	YJL004c	<i>SYS1</i>
168	YJL024c	<i>APS3</i>
169	YJL029c	<i>VPS53</i>
170	YJL044c	<i>GYP6</i>
171	YJL093c	<i>TOK1</i>
172	YJL099w	<i>CHS6</i>
173	YJL129c	<i>TRK1</i>
174	YJL133w	<i>MRS3</i>

	ORF	deletiertes Gen
175	YJL154c	VPS35
176	YJL172w	CPS1
177	YJL178c	ETF1
178	YJL192c	SOP4
179	YJL214w	HXT8
180	YJR001w	AVT1
181	YJR005w	APL1
182	YJR031c	GEA1
183	YJR040w	GEF1
184	YJR044c	VPS55
185	YJR058c	APS2
186	YJR059w	PTK2
187	YJR074w	MOG1
188	YJR077c	MIR1
189	YJR090c	GRR1
190	YJR095w	SFC1
191	YJR121w	ATP2
192	YJR131w	MNS1
193	YJR152w	DAL5
194	YKL002w	DID4
195	YKL016c	ATP7
196	YKL041w	VPS24
197	YKL079w	SMY1
198	YKL080w	VMA5
199	YKL103c	LAP4
200	YKL126w	YPK1
201	YKL129c	MYO3
202	YKL135c	APL2
203	YKL146w	AVT3
204	YKL175w	ZRT3
205	YKL179c	COY1
206	YKL188c	PXA2
207	YKL198c	PTK1
208	YKL199c	YKT9
209	YKL206C	-
210	YKL212w	SAC1
211	YKR014c	YPT52
212	YKR020w	VPS67
213	YKR039w	GAP1
214	YKR052c	MRS4
215	YKR054c	DYN1
216	YKR093w	PTR2
217	YLL024c	SSA2
218	YLL043w	FPS1
219	YLR018c	POM34
220	YLR025w	SNF7

	ORF	deletiertes Gen
221	YLR081w	GAL2
222	YLR083c	EMP70
223	YLR119w	SRN2
224	YLR148w	PEP3
225	YLR170c	APS1
226	YLR207w	HRD3
227	YLR240w	VPS34
228	YLR250w	SSP120
229	YLR262c	YPT6
230	YLR268w	SEC22
231	YLR292c	SEC72
232	YLR295c	ATP14
233	YLR309c	IMH1
234	YLR337c	VRP1
235	YLR348c	DIC1
236	YLR370c	ARC18
237	YLR380W	CSR1
238	YLR396c	VPS33
239	YLR447c	VMA6
240	YML001w	YPT7
241	YML012w	ERV25
242	YML042w	CAT2
243	YML062c	MFT1
244	YML067c	ERV41
245	YML071c	COG8
246	YML097c	VPS9
247	YML103c	NUP188
248	YML111w	BUL2
249	YML123c	PHO84
250	YMR011w	HXT2
251	YMR017w	SPO20
252	YMR054w	STV1
253	YMR058w	FET3
254	YMR089c	YTA12
255	YMR109w	MYO5
256	YMR166c	-
257	YMR183c	SSO2
258	YMR184W	-
259	YMR198w	CIK1
260	YMR231w	PEP5
261	YMR243c	ZRC1
262	YMR264w	CUE1
263	YMR297w	PRC1
264	YMR319c	FET4
265	YNL003c	PET8
266	YNL041c	COG6

	ORF	deletiertes Gen
267	YNL044w	<i>YIP3</i>
268	YNL051w	<i>COG5</i>
269	YNL055c	<i>POR1</i>
270	YNL070w	<i>TOM7</i>
271	YNL079c	<i>TPM1</i>
272	YNL083w	-
273	YNL084c	<i>END3</i>
274	YNL093w	<i>YPT53</i>
275	YNL101w	<i>AVT4</i>
276	YNL121c	<i>TOM70</i>
277	YNL142w	<i>MEP2</i>
278	YNL154c	<i>YCK2</i>
279	YNL183c	<i>NPR1</i>
280	YNL243w	<i>END4</i>
281	YNL268w	<i>LYP1</i>
282	YNL270c	<i>ALP1</i>
283	YNL304w	<i>YPT11</i>
284	YNL318c	<i>HXT14</i>
285	YNL325c	<i>FIG4</i>
286	YNR006w	<i>VPS27</i>
287	YNR007c	<i>AUT1</i>
288	YNR049c	<i>MSO1</i>
289	YNR072w	<i>HXT17</i>
290	YOL013c	<i>HRD1</i>
291	YOL018c	<i>TLG2</i>
292	YOL020w	<i>TAT2</i>
293	YOL044w	<i>PEX15</i>
294	YOL062c	<i>APM4</i>
295	YOL082w	<i>CVT19</i>
296	YOL103w	<i>ITR2</i>
297	YOL122c	<i>SMF1</i>
298	YOR034c	<i>AKR2</i>
299	YOR035c	<i>SHE4</i>
300	YOR036w	<i>PEP12</i>
301	YOR037w	<i>CYC2</i>
302	YOR045w	<i>TOM6</i>
303	YOR070c	<i>GYP1</i>
304	YOR087w	<i>YVC1</i>
305	YOR089c	<i>VPS21</i>
306	YOR094w	<i>ARF3</i>
307	YOR100c	<i>CRC1</i>
308	YOR106w	<i>VAM3</i>
309	YOR106w	<i>Vam3</i>
310	YOR115c	<i>TRS33</i>
311	YOR130c	<i>ORT1</i>
312	YOR185c	<i>GSP2</i>

	ORF	deletiertes Gen
313	YOR216c	<i>RUD3</i>
314	YOR270c	<i>VPH1</i>
315	YOR307c	<i>SLY41</i>
316	YOR316c	<i>COT1</i>
317	YOR327c	<i>SNC2</i>
318	YOR332w	<i>VMA4</i>
319	YOR348c	<i>PUT4</i>
320	YPL019c	<i>VTC3</i>
321	YPL045w	<i>VPS16</i>
322	YPL051w	<i>ARL3</i>
323	YPL065w	<i>VPS28</i>
324	YPL078c	<i>ATP4</i>
325	YPL120w	<i>VPS30</i>
326	YPL125w	<i>KAP120</i>
327	YPL145c	<i>KES1</i>
328	YPL147w	<i>PXA1</i>
329	YPL155c	<i>KIP2</i>
330	YPL174c	<i>NIP100</i>
331	YPL195w	<i>APL5</i>
332	YPL232w	<i>SSO1</i>
333	YPL234c	<i>TFP3</i>
334	YPL259c	<i>APM1</i>
335	YPL271w	<i>ATP15</i>
336	YPR009w	-
337	YPR011c	-
338	YPR017c	<i>DSS4</i>
339	YPR024w	<i>YME1</i>
340	YPR028w	<i>YOP1</i>
341	YPR029c	<i>APL4</i>
342	YPR032w	<i>SRO7</i>
343	YPR036w	<i>VMA13</i>
344	YPR037c	<i>ERV2</i>
345	YPR058w	<i>YMC1</i>
346	YPR095c	<i>SYT1</i>
347	YPR124w	<i>CTR1</i>
348	YPR129w	<i>SCD6</i>
349	YPR141c	<i>KAR3</i>
350	YPR149w	<i>NCE102</i>
351	YPR173c	<i>VPS4</i>
352	YPR185w	<i>APG13</i>

2.2 Plasmide

Die Klonierungs- und Expressionsvektoren, die in dieser Arbeit verwendet bzw. im Rahmen dieser Arbeit neu erstellt wurden, sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 : Auflistung der verwendeten bzw. neu entstandenen Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pCR2.1-TOPO	3,9	<i>E. coli</i> Vektor zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten (TA-Klonierung), Bindungsstelle für M13-Primer zur Sequenzierung des Inserts, Kan ^R , Amp ^R	Invitrogen
pESC-Trp	6,5	2 μ -Vektor mit zwei MCS und hefeeigenem GAL1- und GAL10-Promotor, <i>TRP1</i> -Marker, Amp ^R	Stratagene
pErd2 ^{GFP}	8,0	pESC-Trp-Derivat mit <i>EcoRI/BglII</i> -Fragment, bestehend aus dem Erd2/GFP-Fusionsgen (1,5 kb)	Ries, 2004
pErd2 ^{cmyc}	7,3	pESC-Trp-Derivat mit <i>EcoRI/BglII</i> -Fragment, bestehend aus dem Erd2/cmyc-Fusionsgen (0,8 kb)	Ries, 2004
p α GFP ^{HDEL}	4,4	pFP mit <i>HindIII/EcoRI</i> -Fragment, bestehend aus dem K28-Alpha/GFP/HDEL-Fusionsgen	Spindler, 2004
pYSCE	-	2 μ -Vektor, enthält das intronlose Kopie des Erd2-Gens aus <i>S. cerevisiae</i> <i>Leu2</i> -Marker, Amp ^R	H. Pelham
JS209	-	2 μ -Vektor, enthält eine intronlose Kopie des Erd2-Gens aus <i>S. cerevisiae</i> mit C-terminalem cMyc-Tag, -Marker, Amp ^R	Semenza <i>et al.</i> , 1990

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pCT38	-	pRS316 mit einem 2,6 kb <i>KpnI/XbaI</i> -Fragments des <i>PDI1</i> Gens, <i>URA3</i> -Marker, Amp ^R	Norgaard <i>et al.</i> , 2001
pCT37	-	<i>PDI1</i> -Gen unter Kontrolle eines GAL-Promotors, <i>URA3</i> -Marker, Amp ^R	Holst <i>et al.</i> , 1997
Q3020	-	<i>PDI</i> [<i>CGHS-SGHS</i>], <i>TRP1</i> -Marker, Amp ^R	Holst <i>et al.</i> , 1997
Q3025	-	<i>PDI</i> [<i>SGHS-CGHS</i>], <i>TRP1</i> -Marker, Amp ^R	Holst <i>et al.</i> , 1997
pSL-Ubc4 ^{GFP}	7,1	pPGK mit einem 1,3 kb <i>XhoI/BamHI</i> -Fragment, bestehend aus dem Ubc4/GFP-Fusionsgen, <i>URA3</i> -Marker, Amp ^R	diese Arbeit
YEP110	-	2 μ -Vektor , enthält das Ubiquitin-Gen aus <i>S. cerevisiae</i> mit Lys/Arg-Austausch an Position 48 unter der Kontrolle des induzierbaren <i>CUP1</i> -Promotors <i>TRP1</i> -Marker, Amp ^R	Hochstrasser <i>et al.</i> , 1991
pWO21	-	2 μ -Vektor , enthält das Ubiquitin-Gen aus <i>S. cerevisiae</i> mit Lys/Arg-Austausch an Position 48 und 63 unter der Kontrolle des induzierbaren <i>CUP1</i> -Promotors <i>TRP1</i> -Marker, Amp ^R	Dieter Wolf
pYX242	9,5	2 μ -Vektor mit MCS und hefeeigenem TPI-Promotor, <i>LEU2</i> -Marker, Amp ^R	R&D Systems
pSL-K28	10,5	pYX242-Derivat mit <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment, bestehend aus dem Erd2/cmyc-Fusionsgen (0,8 kb)	diese Arbeit
pSL-K294R	10,5	pESC-Trp-Derivat mit <i>EcoRI/BglII</i> -Fragment, bestehend aus dem Erd2/cmyc-Fusionsgen (0,8 kb)	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten PCR-Primer (Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen sind grau hinterlegt dargestellt)

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
5'-ERD2	CTC GAG GAA TTC ATG AAT CCG TTT AGA ATC TTA GGT ATG TTA CTA TTT GGA	Primer zur Erstellung eines Erd2/GFP-Fusionsgens bzw. Erd2/cmyc-Fusionsgens (<i>XhoI/EcoRI</i>)
3'-ERD2-5'-GFP	GAA CAG CTC CTC GCC CTT GCT CAC TTT TGG CAG TTT GAA ACC CTT TCC TCT G	SOE-Primer zur Erstellung eines Erd2/GFP-Fusionsgens
5'-GFP-3'-ERD2	CAG AGG AAA GGG TTT CAA ACT GCC AAA AGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT C	SOE-Primer zur Erstellung eines Erd2/GFP-Fusionsgens
3'-GFP	AGA TCT GTC GAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG	Primer zur Erstellung eines Erd2/GFP-Fusionsgens (<i>BglII/SalI</i>)
3'ERD2CMYC	AGA TCT GTC GAC TTA CAA ATC TTC TTC AGA AAT CAA TTT TTG TTC TTT TG	Primer zur Erstellung eines Erd2/cmyc-Fusionsgens, enthält die Sequenz des cmyc-Tags (<i>BglII/SalI</i>)
XhoI-UBC4	CTC GAG ATG TCT TCT TCT AAA CGT ATT GCT AAA	Primer zur Erstellung eines Ubc4/GFP-Fusionsgens, (<i>XhoI</i>)
GFP-UBC4	AAC AGC TCC TCG CCC TTG CTC ACC ATT ACA GCG TAT TTC TTT GTC CAT TCT CTG GC	SOE-Primer zur Erstellung eines Ubc4/GFP-Fusionsgens
UBC4-GFP	GCC AGA GAA TGG ACA AAG AAA TAC GCT GTA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TT	SOE-Primer zur Erstellung eines Ubc4/GFP-Fusionsgens
GFP-BamHI	GGA TCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C	Primer zur Erstellung eines Ubc4/GFP-Fusionsgens, (<i>BamHI</i>)
E28	CCG GAA TTC ATG GAG AGC GTT TCC TCA TTA TTT	Primer zur Erstellung von K28-Konstrukten (<i>EcoRI</i>)

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
28H	CCC AAG CTT TTA GCG TAG CTC ATC GTG GCA CCT	Primer zur Erstellung von K28-Konstrukten (<i>HindIII</i>)
K294RFOR	ACG TCC GAG TGT TCT AGG TAC AAT GGT GTC ATC	SOE-Primer zur Erstellung eines K28-K294R-Konstruktes,
K294RREV	GAT GAC ACC ATT GTA CCT AGA ACA CTC GGA CGT	SOE-Primer zur Erstellung eines K28-K294R-Konstruktes,

Tabelle 6: Auflistung der 5'IRD 800 markierten Primer für die DNA-Sequenzierung

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
M13 universal	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	Sequenzierung aus pCR2.1-TOPO
M13 reverse	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	Sequenzierung aus pCR2.1-TOPO
K28cDNA	GGC CTG ACA GCA TCA GCT AAC AAG GTA	Sequenzierung von K28- Konstrukten
5'InnerPrimerGFP	CTC GTG ACC ACC CTG ACC TA	Sequenzierung von GFP- Fusionsgenen
5'InnerPrimerGFP2	GGG GTG GTG CCC ATC CTG	Sequenzierung von GFP- Fusionsgenen
pYES2.1for	AAG GAG AAA AAA CCC CGG ATC GGA CTA CTA	Sequenzierung aus pYES2.1/V5-His-TOPO
pYES2.1rev	GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT	Sequenzierung aus pYES2.1/V5-His-TOPO

2.4 Nährmedien

LB-Medium

Pepton	1,0	%
Hefeextrakt	0,5	%
NaCl	0,5	%
(Agar	1,5	%)

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Zur Selektion von Plasmid-tragenden Klonen wurde dem Medium Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5	%
Pepton	2,0	%
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
MgCl ₂	10	mM
Glukose	20	mM

YEPD-Medium

Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	1,0	%
Glukose	2,0	%
(Agar	1,5	%)

Synthetisches-Medium(SC -Medium)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	%
„Yeast nitrogen base“ (YNB)	0,17	%
Glukose	2,0	%
10x d/o-Lösung	100	ml
H ₂ O _{bidest}	880	ml
(Agar	1,5	%)

10x d/o-Lösung

Isoleucin	300	mg/l
Valin	1500	mg/l
Adenin	200	mg/l
Arginin	200	mg/l
Histidin	200	mg/l
Leucin	1000	mg/l
Lysin	300	mg/l
Methionin	200	mg/l
Phenylalanin	500	mg/l
Threonin	2000	mg/l
Tryptophan	200	mg/l
Tyrosin	300	mg/l
Uracil	200	mg/l

Zur Herstellung der jeweiligen 10xd/o-Lösung wurde(n) die zur Selektion der Hefen nötige(n) Aminosäuren weggelassen. Die 10x- d/o-Lösung sowie die Glukose-Lösung wurden getrennt voneinander autoklaviert. YNB wurde in 20 ml sterilem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Methylenblauagar

Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	1,0	%
Glukose	2,0	%
Zitronensäure	2,35	%
K ₂ HPO ₄	3,17	%
Methylenblau	0,003	%
Agar	1,5	%

Agar-Agar und Glukose wurden getrennt von den anderen Bestandteilen autoklaviert. Der pH-Wert des Grundmediums wurde mit K₂HPO₄ auf 4,7 eingestellt. Zur weiteren Verwendung wurde der MB-Agar zu je 15 ml in sterile Reagenzgläser pipettiert.

Minimal-Methylenblauagar

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	%
„Yeast nitrogen base“ (YNB)	0,17	%
Glukose	2,0	%
10x d/o-Lösung	100	ml
H ₂ O _{bide}	880	ml
Agar	1,5	%

Die 10x- d/o-Lösung sowie die Glukose/Agar-Agar-Lösung wurden getrennt von den anderen Bestandteilen autoklaviert. Der pH-Wert des Grundmediums wurde mit K₂HPO₄ auf 4,7 eingestellt. YNB wurde in 20 ml sterilem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Zur weiteren Verwendung wurde der Minimal-MB-Agar zu je 15 ml in sterile Reagenzgläser pipettiert.

YEPD-Regenerationsagar

Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	1,0	%
Glukose	2,0	%
KCl	0,6	M
Agar	1,5	%

Der pH-Wert wurde mit 6 M HCl auf 4,7 eingestellt.

B-Medium nach Pfeiffer und Radler (1982)Lösung 1

Glukose	50	g
H ₂ O	ad 180	ml

Lösung 2

Inosit	0,04	g
Tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O	0,5	g
D,L-Äpfelsäure	20	g
KH ₂ PO ₄	1,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	g
MgSO ₄	1,0	g
CaCl ₂	0,5	g

H₂O ad 700 ml, pH 4,7 mit KOH

Die Lösungen 1 und 2 wurden getrennt autoklaviert.

10x Aminosäurestammlösung	100 ml
100x Vitaminstammlösung	10 ml
100x Spurenelementestammlösung	10 ml

Die drei Stammlösungen wurden 20 Minuten in strömendem Dampf bei 100°C getrennt sterilisiert und anschließend dem B-Medium hinzugefügt.

5´FOA-Medium

Lösung 1

5´FOA	1	g
2,4 mg/ml Uracil-Lösung	5	ml
H ₂ O		ad 500 ml

Lösung 2

YNB	1,7	g
NH ₄ SO ₄	5	g
Glukose	20	g
Uracil-d/o-Mix	1,3	g
Agar	20	g
H ₂ O		ad 500 ml

Die Lösung 1 wurde eine Stunde bei leichter Hitze gerührt und sterilfiltriert.

Die Lösung 2 wurde autoklaviert, auf 65°C abgekühlt und mit Lösung 1 vereinigt.

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Standard-Puffer

7,5 M Ammoniumacetat

Ammoniumacetat	7,5	M
----------------	-----	---

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

70% Ethanol

Ethanol	70%	(v/v)
---------	-----	-------

10%-iges Glycerin

Glycerin	10%	(v/v)
----------	-----	-------

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert

10 x TE-Puffer

Tris/HCl	10	mM
EDTA	1	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

2.5.2 Puffer zu Bindungstests und Aufnahmestudien von K28-ToxinTris/HCl-Puffer

Tris/HCl	0,1	M
DTT	5	mM
EDTA	5	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Sorbit-Puffer

Sorbit	1,2	M
Na ₂ HPO ₄	0,5	M

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Der Puffer wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine:

Zu einer 0,1 M Citrat-Lösung wurde 0,2 M Na_2HPO_4 -Lösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,7 gegeben. Die Lösung wurde durch Zugabe von Sorbit (1,2 M) osmotisch stabilisiert und autoklaviert.

2.5.3 Puffer zur alkalischen LyseGTE-Lösung

Glukose	50	mM
Tris/HCl, pH 8,0	25	mM
EDTA	10	mM

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

Kaliumacetat-Lösung

Zur Herstellung einer 5 M Kaliumacetat-Lösung wurden 29,5 ml Eisessig mit KOH-Plätzchen auf einen pH-Wert von 4,8 eingestellt, mit Aqua bidest auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert.

NaOH/SDS-Lösung

NaOH	0,2	M
SDS	1	%

2.5.4 Puffer zur Isolierung chromosomaler DNAAmmoniumacetat-Lösung

$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$	4	M
-----------------------------------	---	---

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

RNase A

1 mg RNase A wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst, in Aliquots bei -20°C gelagert und vor Gebrauch auf $2\ \mu\text{g/ml}$ in TE-Puffer verdünnt.

„Breaking Buffer“

Triton-X-100	2	%
SDS	1	%
NaCl	100	mM
Tris/HCl, pH 8,0	100	mM
EDTA, pH 8,0	1	mM

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.5 Puffer zur Agarosegelelektrophorese„Gel-loading-Buffer“ (GLB)

Glycerin (96%)	50	%
SDS	1	%
EDTA	125	mM
Bromphenolblau	0,05	%
Xylencyanol	0,05	%

10 xTBE-Puffer

Tris/HCl	0,89	M
Borsäure	0,89	M
EDTA	20	mM

2.5.6 Puffer zur LiAc-Transformation

10 xLithiumacetat (LiAc)

Lithiumacetat	1	M
---------------	---	---

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

50% Polyethylenglycol

PEG-4000	50	%
----------	----	---

Die Lösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur aufbewahrt.

LiAc/TE-Lösung

10 xTE-Puffer	1 Teil
10 xLiAc-Lösung	1 Teil
H ₂ O _{steril}	8 Teile

PEG-Lösung

50% PEG-4000	8 Teile
10 xTE-Puffer	1 Teil
10 xLiAc-Lösung	1 Teil

2.5.7 Puffer zur SDS-PAGE

Probenpuffer

SDS (10%(w/v))	1	ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	2	ml
Glycerin	2,4	ml
Bromphenolblau	0,4	ml
H ₂ O _{steril}	4	ml

Sammelgel/Trenngel-Puffer für Tris/Tricin-Gele

Tris-HCl, pH 8,45	3	M
SDS	0,3%	(w/v)

5 x Anodenpuffer

Tris-HCl, pH 8,9	1	M
------------------	---	---

5 x Kathodenpuffer

Tris	500	mM
Tricin	500	mM
SDS	0,5%	(w/v)

2.5.8 Puffer zum Western-BlotTransferpuffer

Tris-HCl	25	mM
Glycin	190	mM
SDS	0,1%	(w/v)
Methanol	20%	(v/v)

10 x TBS-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	1	M
NaCl	1	M

Waschpuffer

Tween-20	0,3%	(v/v)
		in 1 x TBS-Puffer

Blockingpuffer

Waschpuffer	50	ml
Gelatine	1%	(w/v)

Färbepuffer

Tris-HCl, pH 9,5	100	mM
NaCl	100	mM
MgCl ₂	50	mM

Die Komponenten wurden einzeln angesetzt und erst kurz vor Gebrauch vereinigt. In 10 ml Färbepuffer wurden 20 µl NBT/BCIP-Stammlösung verdünnt.

2.5.9 Puffer zur Zellyse und Zellfraktionierung von *S. cerevisiae*Sphäroplastierungspuffer

Sorbit	800	mM
Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
CaCl ₂	10	mM
DTT	2	mM
Zymolyase-20T	200	ng/ml

DTT wurde sterilfiltriert und anschließend zu der autoklavierten Lösung gegeben. Die Zymolyase wurde erst kurz vor Gebrauch zugegeben. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

Waschpuffer

Sorbit	800	mM
Hepes-KOH, pH 7,0	20	mM
K-Acetat	50	mM
EDTA	2	mM

Inkubationspuffer

Sorbit	800	mM
Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
CaCl ₂	10	mM
Glukose	10	mM

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Lysepuffer

Sorbit	800	mM
Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
CaCl ₂	10	mM
Glukose	10	mM

Der Puffer wurde autoklaviert; kurz vor Gebrauch wurden Protease-Inhibitoren („Protease inhibitor cocktail tablets“, Roche) zugegeben.

2.5.10 Puffer zur Immunpräzipitation

Lysepuffer

1 x PBS wurde mit EDTA (5 mM) und 0,02% (w/v) Natriumazid versetzt. Kurz vor Gebrauch wurden Protease-Inhibitoren („Protease inhibitor cocktail tablets“, Boehringer Mannheim) zugegeben.

Waschpuffer

Triton-X-100	0,1%	(v/v)
Tris-HCl, pH 7,4	50	mM
NaCl	300	mM
EDTA	5	mM
Natriumazid	0,02%	(w/v)

Kurz vor Gebrauch wurden Protease-Inhibitoren („Protease inhibitor cocktail tablets“, Boehringer Mannheim) zugegeben.

2.5.11 Puffer zur Immunfluoreszenz

PBS-Puffer

KH ₂ PO ₄	50	mM
NaCl	150	mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt.

Phosphat-Puffer

KH ₂ PO ₄	0,1	M
---------------------------------	-----	---

Der pH wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt.

Phosphat-Sorbit-Puffer

KH ₂ PO ₄	0,1	M
Sorbit	1,2	M

Der pH wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt.

PBST-Puffer

KH ₂ PO ₄	0,01	M
K ₂ HPO ₄	0,04	M
NaCl	0,15	M
Natriumazid	0,1 g/100 ml	
BSA	10 mg/ml	

2.6 Kulturbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium auf einem Rundschtüttler bei 37°C und 220 Upm. LB-Agarplatten wurden in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte in YEPD-Flüssigmedium oder entsprechendem d/o-Medium auf einem Rundschtüttler bei 30°C und 220 Upm. YEPD- bzw. d/o-Agarplatten wurden bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

2.7 Zellzahlbestimmung

2.7.1 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl von *S. cerevisiae* wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) mikroskopisch bestimmt.

2.7.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Kulturlösungen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem UV-Spektrophotometer Biochrom 4060 (Pharmacia, Freiburg) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm.

2.8 Produktion von K28-Killertoxinkonzentrat

Mit Hefezellen des Stammes *S. cerevisiae* JR1 bzw. SK2-2 wurde eine erste Vorkultur in 5 ml B-Medium 1%ig beimpft. Das Volumen der zweiten Vorkultur betrug zweimal 50 ml, das der Hauptkultur zweimal 2,5 l. Die Vorkulturen wurden 24 h bei 30°C und 190 Upm auf einem Rundschüttler inkubiert. Die zweite Vorkultur und die beiden Hauptkulturen wurden jeweils mit dem gesamten Volumen der entsprechenden Vorkultur beimpft. Die Inkubation der Hauptkulturen erfolgte für 4 Tage bei 20°C unter leichtem Schütteln (60 Upm), um eine Inaktivierung des Killertoxins durch einen zu hohen Eintrag an Luftsauerstoff zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten bei 4°C und 10.000 Upm abzentrifugiert. Der Toxinhaltige Überstand wurde bei 4°C gelagert.

2.8.1 Ultrafiltration

Der zellfreie toxinhaltige Kulturüberstand wurde unter Stickstoff-Atmosphäre bei 4°C und einem Druck von 1 bar im Sartorius-Ultrafiltrations-System „Easy-Flow“ über eine Polysulfonsäuremembran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa um das 15-fache eingeeengt. Das erhaltene Toxinkonzentrat wurde erneut abzentrifugiert, um noch vorhandene Zellen zu entfernen, und danach in einer Amicon-Filterzelle 8400 über eine OMO 10076-Membran (Ausschlussgrenze 10 kDa) bei 4°C unter 2,5 bar Stickstoffatmosphäre nochmals eingeeengt, so dass 100- bis 150-fach konzentrierte Toxinlösungen entstanden.

2.8.2 Sterilfiltration

Das verbliebene Killertoxinkonzentrat wurde über einen Minisart-Filter der Firma Sartorius (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.9 Methylenblau-Agar-Diffusionstest (MBA-Test)

2.9.1 Killertest

Der Nachweis der Killertoxinaktivität eines Hefestammes erfolgte im Agardiffusionstest nach Woods und Bevan (1968). Für den Killertest wurde der K28-hypersensitive Stamm *S. cerevisiae* 192.2d als sensitiver Indikatorstamm verwendet, von dem etwa 10^5 Zellen in Reagenzgläser mit 15 ml verflüssigtem und auf 48°C temperiertem Methylenblau-Agar (MBA) eingebettet wurden. Nach Erstarren des Agars wurden 10 µl des zu testenden Killerstammes auf den Agar aufgetropft. Die Killeraktivität der Hefen zeichnete sich durch die Bildung einer klaren Hemmzone sowie einer äußeren blau gefärbten Abtötungszone des sensitiven Teststammes aus.

2.9.2 Test auf Resistenz/Sensitivität

2.9.2.1 Test auf Resistenz/Sensitivität an intakten Zellen

Um einen *S. cerevisiae* Stamm auf Sensitivität bzw. Resistenz gegen K28 zu testen, wurden 10^5 Zellen des entsprechenden Stammes, wie im Abschnitt 2.9.1 beschrieben, in Methylenblauagar eingebettet. Nach Erstarren des Agars wurden mit Hilfe eines Korkbohrers Löcher mit einem Durchmesser von 9 mm in den Agar gestanzt und 100 µl eines K28-Konzentrates, das aus den Superkillerstämmen *S. cerevisiae* JM8-2a (Maurer, 1999) oder SK2-2 (Reiter, 2004) gewonnen wurde, einpipettiert. Die Platten wurden für vier Tage bei der angegebenen Temperatur inkubiert und die Sensitivität/Immunität wurde anhand des Hemmhofdurchmessers (klare Hemmzone und äußere, blau gefärbte Abtötungszone) ermittelt.

2.9.2.2 Test auf Resistenz/Sensitivität an Sphäroplasten

Zur Untersuchung der Killertoxinwirkung auf Sphäroplasten erfolgte die Präparation der Sphäroplasten wie unter Punkt 2.11.1 aufgeführt. Die

Sphäroplasten wurden in 1,2 M Sorbit-Lösung gewaschen und auf eine Konzentration von 1 bis 5×10^8 Zellen/ml eingestellt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-1} wurden jeweils 0,1 ml in 5 ml verflüssigten Regenerationsagar (48°C; pH 4,7) überführt und über einer bereits 10 ml Regenerationsagar enthaltenden Agarplatte ausgegossen. Anschließend wurden die Sphäroplasten nach der unter Punkt 2.9.2.1 beschriebenen Methode auf Resistenz bzw. Sensitivität gegen das Killertoxin K28 überprüft. Um den Anteil an nicht sphäroplastierten Zellen zu ermitteln, wurden 0,1 ml der Zellsuspension mit 1×10^7 bis 1×10^8 Zellen/ml in 3 ml steriles Wasser überführt und zwei Minuten auf dem „Vortex“ geschüttelt, um Sphäroplasten zu lysieren. Anschließend wurden eventuell noch vorhandene intakte Zellen abzentrifugiert (15 min; 3.500 Upm), in 0,1 ml sterilem Wasser aufgenommen, auf YEPD-Agar ausplattiert und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

2.10 Eichung der Toxinkonzentration im Agardiffusionstest

Um einen quantitativen Vergleich der relativen Toxin-Sensitivitäten zwischen verschiedenen Hefestämmen durchführen zu können, musste eine Eichung der Toxinkonzentration gegen den Hemmhofdurchmesser des verwendeten Stammes im entsprechenden Methylenblauagar durchgeführt werden. Infolge der Toxin-Diffusion in den Agar bildet sich ein Konzentrationsgradient aus, wobei die Konzentration des Toxins vom Stanzloch bis zum Rand der Platte logarithmisch abnimmt. Geringe Änderungen im Hemmhofdurchmesser der untersuchten Stämme entsprechen daher weitaus höheren bzw. geringeren Sensitivitäten, als durch den gemessenen Hemmhofdurchmesser zum Ausdruck gebracht werden kann. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden jeweils 100 µl verschiedener Toxinverdünnungsstufen in ein aus einer Agarplatte (mit entsprechend eingebettetem Hefestamm) ausgestanztes Loch pipettiert und nach dreitägiger Bebrütung bei 20°C die Hemmhofdurchmesser bestimmt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Toxinkonzentrationen gegen die korrespondierenden Hemmhofdurchmesser halblogarithmisch aufgetragen.

2.11 Bindungstests von K28-Toxin an sphäroplastierten Hefezellen

2.11.1 Sphäroplastierung

In osmotisch stabilisiertem Medium können durch Verdau der Hefezellwand sphäroplastierte Hefezellen gewonnen werden. Dies ermöglicht eine Untersuchung zur Bindung von K28 an den Sekundärrezeptor in der Plasmamembran sensitiver Hefezellen, weitgehend ohne den störenden Einfluss der Hefezellwand und der darin enthaltenen Primärrezeptoren. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine von Zhu und Bussey (1989) entwickelte Methode.

Zur Präparation der Sphäroplasten wurden die Hefezellen in Ura d/o-Flüssigmedium bis zu einer Zellzahl von 2 bis 5×10^7 Zellen/ml kultiviert, danach abzentrifugiert (10 min, 5.000 Upm), zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und in einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml in Tris/HCl-Puffer aufgenommen. Der Zusatz von EDTA diente der Komplexierung von stabilisierenden Ca^{2+} -Ionen, DTT zur Reduktion von Disulfidbrücken innerhalb der Zellwand. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 30°C und 150 Upm leicht geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren (10 min, 5.000 Upm) und Waschen mit sterilem Wasser wurden die Zellen in sterilem Sorbit-Puffer in einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Das Sorbit diente hierbei als osmotischer Stabilisator. Dem Versuchsansatz wurden 500 µg/ml Zymolyase-20T zugesetzt, welche spezifisch β -1,3-glykosidische Bindungen linearer Glukose-Polymere hydrolisiert. Nach einer Inkubation für 45-90 Minuten auf dem Schüttler (30°C, 130 Upm) erfolgte die Überprüfung der Sphäroplastierung. Dazu wurde das Verhalten der Zellen in Gegenwart einer 10%-igen SDS-Lösung unter dem Mikroskop verfolgt. Die sphäroplastierten Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 2.500 Upm), zweimal mit sterilem Sorbit-Puffer gewaschen und in McIlvaine-Puffer resuspendiert.

2.11.2 Bindungsstudien

In Anlehnung an eine von Al-Aidroos und Bussey (1978) entwickelte und von Schmitt und Radler (1988) modifizierte Methode wurde die Bindung von K28-Killertoxin an sphäroplastierten Zellen untersucht. Dazu wurden die

jeweiligen Stämme zunächst über Nacht in ura d/o-Galaktose-Medium bis zu einer Zellzahl von 5×10^7 Zellen/ml kultiviert und anschließend, wie unter Punkt 2.11.1 beschrieben, sphäroplastierte. Nachdem die sphäroplastierten Zellen in McIlvaine-Puffer resuspendiert wurden, wurden Verdünnungsstufen von 10^{-2} bis 10^{-6} hergestellt. Jeweils 0,5 ml einer Verdünnungsstufe wurden mit 0,5 ml K28-Toxinkonzentrat in einem Eppendorfgemisch und für eine Stunde bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In den nach der Zentrifugation (20 min, 10.000 Upm) erhaltenen Überständen wurde mit Hilfe des Agardiffusionstests die Menge an ungebundenem Killertoxin ermittelt. Als sensitiver Indikatorstamm diente *S. cerevisiae* 192.2d.

2.12 Untersuchung zur Aufnahme von K28-Toxin an intakten Zellen

Um die Aufnahme von K28-Toxin in Hefestämme über einen zeitlichen Verlauf verfolgen zu können, wurde ein Hefestamm in 200 ml entsprechendem Medium bis zu einer Zellzahl von 5×10^7 Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden sedimentiert (5.000 Upm, 10 min, Raumtemperatur), zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 10 ml McIlvaine-Puffer aufgenommen. Jeweils 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden mit 0,5 ml Toxinkonzentrat versetzt und über verschiedene Zeiträume bei 20°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Zur Kontrolle der Toxinstabilität dienten zellfreie Ansätze mit 0,5 ml Toxinkonzentrat und 0,5 ml McIlvaine-Puffer. Anschließend wurden die Ansätze 20 min bei 10.000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Aliquots der erhaltenen Überstände wurden in einer SDS-PAGE mit nachfolgendem Western-Blot auf ihren verbliebenen Toxingehalt überprüft bzw. im MBA-Test gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d eingesetzt und die erhaltenen Hemmhöfe bestimmt.

2.13 Plasmidisolierung aus *E. coli*

2.13.1 Alkalische Lyse

Die alkalische Lyse ermöglicht die schnelle Aufreinigung von Plasmid-DNA in großen Mengen. Diese ist jedoch in einem erheblichen Maße mit Proteinen und RNA verunreinigt, was eine spätere Behandlung der DNA mit DNase-

freier RNase notwendig macht. Das in der GTE-Lösung enthaltene EDTA komplexiert die bivalenten Metallkationen, die die Zytoplasmamembran stabilisieren. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt durch Zugabe von SDS, welches als anionisches Detergenz Proteine und Proteinkomplexe solubilisiert. Nach Zugabe von NaOH zur Denaturierung von Plasmid- und chromosomaler DNA, erfolgt eine Neutralisierung durch Kaliumacetat, welches zu einer Rückbildung von doppelsträngiger Plasmid-DNA führt. Bei der anschließenden Zugabe von Ethanol kommt es zur Aggregation der Nukleinsäuremoleküle und zur nachfolgenden Präzipitation, während niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze in Lösung bleiben (Birnboim and Doly, 1979).

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB_{Amp} mit einem Klon einer *E. coli* Transformante angeimpft und über Nacht auf einem Rundschtüttler (37°C, 220 Upm) kultiviert. Von der Kultur wurden 1,5 ml abzentrifugiert (20 s, 12.000 Upm, RT), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert. Nach zehnteiliger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung und nach vorsichtigem Mischen fünf Minuten auf Eis lysiert. Der Ansatz wurde mit 150 µl einer 5 M KAc-Lösung (pH 4,8) neutralisiert, durch Invertieren gemischt und fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach einer vierminütigen Zentrifugation (12.000 Upm, RT) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 800 µl 95%-igem EtOH versetzt, zwei Minuten präzipitiert und abzentrifugiert (1 min, 12.000 Upm, RT). Das DNA-Pellet wurde in 70%-igem EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet, in 20 µl H₂O_{bidest} resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.13.2 Plasmidisolierung mittels PEQLAB Plasmid-Miniprep Kit

Um größere Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* in reiner Form zu erhalten, wurden die Präparationen mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit II der Firma PEQLAB nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Die verwandte Methode basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit nachfolgender Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine HiBind[®]-Miniprep-Säule, wobei die Plasmid-DNA an die in der Säule enthaltene Silikamembran bindet. Durch einfaches Waschen wurde die Plasmid-DNA von

Kontaminationen und Enzyminhibitoren gereinigt und im Anschluss an das Trocknen der Säule mit Wasser eluiert. Aufgereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.14 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Bei der Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe sollten folgende Punkte bei der Wahl der Methode beachtet werden: rasche Inaktivierung zellulärer DNasen, Vermeidung von mechanischen Scherkräften, um eine unspezifische Fragmentierung der DNA zu vermeiden, sowie eine restlose Entfernung der DNA-assoziierten Proteine, um die DNA leicht und vollständig durch Restriktionsenzyme hydrolysieren zu können (Bertram and Gassen, 1991). Die Phenolextraktion stellt eine Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nucleinsäuren und Proteinen dar. Die Phenol-Wasser-Phase dient gleichzeitig als Lösungsmittel für die denaturierten Proteine. Verbliebenes Phenol wird in der Regel durch Alkoholfällung entfernt.

Eine 10 ml YEPD-Kultur wurde mit einem Klon einer Hefe-Transformante angeimpft und über Nacht bei 30°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Die Kultur wurde über fünf Minuten bei 3.000 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in 0,5 ml Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet durch Vortexen gelöst. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen in 200 μl „breaking buffer“ resuspendiert, 0,3 g Glasperlen ($\sim 200 \mu\text{l}$ Volumen) und 200 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugefügt und das Pellet in einer Schwingmühle zweimal für 30 s zerstört. Danach wurden 200 μl TE-Puffer zugefügt, vorsichtig gevortext und der Ansatz fünf Minuten bei Höchstgeschwindigkeit und Raumtemperatur abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um 1 ml 100%iges Ethanol ergänzt und durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde drei Minuten bei 12.000 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 400 μl TE-Puffer gelöst. Zum Abbau von RNA-

Verunreinigungen und zur DNA-Isolierung wurden dem Ansatz 30 µl DNase-freie RNase A zugegeben, gemischt und fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 100%iges Ethanol zugegeben und gemischt. Nach dreiminütiger Zentrifugation (12.000 Upm, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und die DNA in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.15 DNA-Reinheits und -Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wässriger Lösungen wurde mit dem „GeneQuant“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech bestimmt. Die Messung der UV-Absorption der DNA-Lösung erfolgte in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen Wasser als Referenz. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, das von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} gibt Aufschluss über das Verhältnis von DNA zu Proteinen und dient zur Bestimmung der Reinheit der DNA. Der Wert sollte etwa 1,8 betragen.

2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäure-Bereiche aus einem Gemisch aus Nukleinsäure-Molekülen. Die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz erfolgt mit Hilfe zweier Oligonukleotid-Primer, die zu Regionen auf einander gegenüberliegenden DNA-Strängen komplementär sind, und wird in alternierenden Zyklen aus drei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Die zu amplifizierende doppelsträngige DNA wird in einem ersten Schritt bei 94°C denaturiert, um in einem zweiten Schritt bei einer auf die Oligonukleotid-Primer abgestimmten Annealing-Temperatur deren Anlagerung an die dann einzelsträngige DNA zu gewährleisten. Im dritten und letzten Schritt erfolgt schließlich eine Neusynthese (Elongation) der spezifischen DNA-Sequenz bei 72°C an den Oligonukleotid-Primern durch die *Taq*-Polymerase (Mullis, 1990; Saiki *et al.*, 1988). Durch die Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte erhält man eine exponentielle Vervielfältigung des neusynthetisierten DNA-Fragments. Die PCR wurde in einem Thermocycler „OmniGene“ der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR

bzw. SOE-PCR (siehe 2.16.1) und wurde ausgehend von Plasmid- oder genomischer DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden zur Größen- und Konzentrationsbestimmung auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.16.1 SOE-PCR

Die Methode der SOE-PCR („splicing by overlapping extension“) erlaubt die Konstruktion von Fusionsgenen während der PCR und umgeht somit eine Fusionierung der Gene über Schnittstellen. Dazu werden in einer ersten PCR in zwei getrennten Ansätzen die jeweiligen Gene so amplifiziert, dass sie im zu fusionierenden Bereich komplementäre Sequenzen besitzen. In einer zweiten PCR lagern sich diese komplementären Sequenzen zusammen und das gesamte Fusionsgen wird durch die verwendeten Primer amplifiziert (Horton *et al.*, 1989).

2.16.2 Oligonukleotide

Die Primer-Synthese erfolgte durch die Firma MWG-Biotech. Die Sequenzierprimer wurden am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiert.

2.17 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in beiden Strängen eines dsDNA-Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen Phosphodiester-Bindungen spalten. Die für gentechnologische Experimente wichtigsten Enzyme sind die TypII-Restriktionsendonukleasen, bei denen die DNA-Bindungs- und Schnittstellen identisch sind. Bei der Spaltung von DNA durch diese Restriktionsendonukleasen entstehen entweder glatte („blunt ends“) oder einander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky ends“). Bei allen Restriktionen wurden 0,5-1 μg Plasmid-DNA in 20 μl -Ansätzen mit drei Units an Restriktionsenzymen der Firma Roche versetzt und unter Verwendung der geeigneten Puffer für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde den Restriktionsansätzen, bei denen Plasmid-DNA aus alkalischer Lyse eingesetzt wurde, fünf Units

DNase-freie RNase zugegeben, um vorhandene RNA zu entfernen. Das Ergebnis des Restriktionsverdau wurde wie unter Punkt 2.18 aufgeführt im Agarosegel elektrophoretisch überprüft.

2.18 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis und die Analyse isolierter Plasmid- oder genomischer DNA sowie die Trennung linearer Plasmid-DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Elektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung genutzt wird. Das Wanderungsverhalten von Makromolekülen in derartigen Gelen hängt u.a. von der Stärke des angelegten Feldes, der Nettoladung, der Form und der Größe der Makromoleküle, deren Ionenstärke sowie der Porengröße und der Temperatur der verwendeten inerten Matrix ab.

Die Gelelektrophorese wird in einer elektrisch neutralen festen Gelmatrix aus Agarose durchgeführt. Agarosegele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur als Molekularsiebe, deren Porengrößen durch die Agarosekonzentration bestimmt werden. Wegen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren bei allen pH-Werten negativ geladen und wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Die Gelelektrophorese wurde in 1%-igen Agarosegelen in 1xTBE-Puffer bei konstanter Spannung von 8-10 V/cm nach Sambrook (1989) durchgeführt. TBE-Puffer erhöht in Agarosegelen in der Regel die molekulare Siebwirkung des Gels. Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren und die Elektrophoresefront zu markieren, wurden die Proben mit einem Viertel des Volumens an „Gel-loading“-Puffer (GLB) versetzt. Die im GLB-Puffer enthaltenen Elektrophorese-Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol wandern wie ein DNA-Fragment einer Länge von 300 bp bzw. 4 kbp. Zur Analyse isolierter Plasmid-DNA wurden 5 µl des Größenmarkers „Smart Ladder“ der Firma Eurogentec verwendet. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Agarosegel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid gehört zu den DNA-bindenden Substanzen,

die sich zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls einlagern können. Der resultierende Ethidiumbromid/DNA-Komplex fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm rotorange und erlaubt so eine visuelle Detektion der DNA-Banden. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit Hilfe des „E.A.S.Y. Plus Systems“ der Firma Herolab .

2.19 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA aus TAE- oder TBE-Agarosegelen wurde mit Hilfe des „Perfectprep Gel Cleanup“ Kit der Firma Eppendorf nach Angaben des Herstellers extrahiert.

2.20 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren in Anwesenheit von ATP und NAD⁺ die Bindung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxyl-Gruppe und ermöglichen so die Klonierung von spezifischen DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren.

Zur Durchführung einer „sticky end“-Ligation wurde das zu klonierende DNA-Fragment mit dem linearisierten Vektor in Anwesenheit von T4-DNA-Ligase inkubiert. Dem Ligationsansatz wurde ein Unit T4-DNA-Ligase zugesetzt. Das Volumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl. Vektor und Insert wurden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde 16 Stunden bei 14°C inkubiert. Vor der Transformation in *E. coli* wurde er zur Verringerung des Salzgehaltes auf einen 0,025 µm Dialysefilter (Fa. Millipore) pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur gegen 10%-iges Glycerin dialysiert. Zur Transformation von *E. coli* DH5α mittels Elektroporation (siehe Punkt 2.22) wurden 7 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.21 TOPO[®]-Klonierung von PCR-Produkten und Sequenzierung

2.21.1 TOPO-Klonierung

PCR-Amplifikate wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Fa. Invitrogen) zwischenkloniert. Die mit der *Taq*-Polymerase erzeugten PCR-Produkte besitzen an ihren 3'-Enden überhängende Adenin-Reste, die mit Hilfe einer an den linearisierten TOPO-Vektor gebundenen Topoisomerase mit den im Vektor vorhandenen 3'-T-Enden verknüpft werden. Nach erfolgter Transformation in *E. coli*, Blau-Weiß-Selektion und Restriktionsanalyse wurden entsprechende Insert enthaltende TOPO-Vektoren mittels M13-Primern sequenziert. Danach erfolgte die Umklonierung der korrekten Insert-Sequenzen in Hefe-Expressionsvektoren.

Um die Umklonierung in einen Hefe-Expressionsvektor umgehen zu können, wurde der Shuttle-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO[®] (Fa. Invitrogen) benutzt. Dieser vereint die Vorteile der schnellen TOPO-Klonierung und Sequenzierung, mit denjenigen eines Hefe-Expressionsvektors, der unter der Kontrolle des induzierbaren GAL1-Promotors steht. Es erfolgte lediglich eine Restriktionsanalyse zur Kontrolle der korrekten Orientierung der Insert-Sequenz.

2.21.2 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977). Die DNA-Sequenzierung fand unter Verwendung des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) und standardisierten 5'-End-IRD800 fluoreszenzmarkierten M13-Primern statt. Die Sequenzierung mit dem „GeneReadir 4200“ (Fa. LiCor) erfolgte nach Anweisung der „Sequencing brochure“ (MWG-Biotech, Version 3, 1997).

2.22 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen, exponentiell wachsenden und zu transformierenden Zellen

durchlässig gemacht. Mit dieser Technik können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen mit hoher Effizienz transformiert werden (Dower *et al.*, 1988; Shigekawa and Dower, 1988). Um die bakteriellen Zellen für die Aufnahme von DNA-Molekülen zugänglicher zu machen, werden diese einer kurzfristigen Glycerin-Behandlung ausgesetzt (Glycerin-Schock). Man bezeichnet die entsprechend vorbereiteten Zellen auch als kompetent. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1% Inokulum einer frischen *ÜN*-Kultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und auf einem Rundschtüttler bei 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis gestellt, danach fünf Minuten bei 8.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 100 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin dreimal gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 8.000 Upm und 4°C. Das Pellet wurde in gleichem Volumen 10%-igen Glycerins vorsichtig resuspendiert, in Aliquots zu jeweils 40 μ l in Reaktionsgefäße überführt und bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden elektrokompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 α auf Eis aufgetaut und die entsprechende Menge an Plasmid-DNA zugegeben. Die Elektroporation erfolgte in einer eisgekühlten 0,2 cm-Elektroporationsküvette mit einem „Gene-Pulser“ der Firma Bio-Rad bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω . Danach wurde zügig 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt und die Zellen eine Stunde bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz inkubiert. Aliquots des Ansatzes wurden auf LB-Antibiotikum-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.23 Transformation von *S. cerevisiae* nach der LiAc-Methode

Die Lithiumacetat-Methode zur Transformation von *S. cerevisiae* beruht auf der Beobachtung, dass Alkali-Kationen die Kompetenz von Hefezellen zur Aufnahme von DNA stark erhöhen (Ito *et al.*, 1983). 100 ml YEPD-Medium

wurden mit 10 µl einer Übernacht-Kultur des entsprechenden Hefestammes beimpft und erneut über Nacht bei 30°C auf einem Rundschrüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 inkubiert. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde die Kultur durch Zugabe von frischem YEPD-Medium in einem Volumen von 100 ml auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 eingestellt und erneut bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5±0,1 kultiviert. Die Zellen wurden geerntet (5 min, 6.000 Upm, RT), das Pellet in 10 ml sterilem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 7.000 Upm, RT). Das Zellpellet wurde anschließend in maximal 600 µl LiAc/TE-Lösung resuspendiert; nachfolgend wurden jeweils 200 µl der Hefesuspension mit der entsprechenden Menge Plasmid-DNA, 20µl hitzedenaturierter „Carrier-DNA“ (Heringssperma-DNA, 10mg/ml) und 1,2 ml frisch hergestellter PEG-Lösung (960 µl 50%-iges PEG-4000, je 120 µl 10 x TE-Puffer und 10 x Lithiumacetat-Stammlösung) vermischt und 30 Minuten bei 30°C auf dem Rundschrüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA-Aufnahme durch einen 15-minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgelöst. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 500 µl 1xTE-Puffer gewaschen und in 500 µl 1xTE-Puffer aufgenommen. Zum Abschluss wurden die Hefen auf geeignete synthetische Medien ausplattiert und zwei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert.

2.24 Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation von *S. cerevisiae*

Der Zellaufschluss und die differentielle Zentrifugation zum Nachweis von internalisiertem K28-Toxin in toxinbehandelten Zellen erfolgte nach einem Protokoll nach Seaman *et al.*

2.24.1 Sphäroplastierung

Eine logarithmisch wachsende Kultur des verwendeten Hefestammes (200 ml) wurde bei einer Zellzahl von etwa 1×10^7 Zellen/ml geerntet und das erhaltene Pellet in A. dest. gewaschen. Danach erfolgte eine Sphäroplastierung der Zellen in 100 ml Sphäroplastierungspuffer bei 30 C und 90 Upm, bis 80-90% der Zellen als Sphäroplasten vorlagen. Dies wurde durch Zugabe von 10%-iger SDS-Lösung mikroskopisch überprüft.

2.24.2 Inkubation der sphäroplastierten Hefen mit K28-Killertoxinkonzentrat

Die sphäroplastierten Zellen wurden 10 Minuten bei 2.000 Upm zentrifugiert, mit Inkubationspuffer gewaschen und in 50 ml Inkubationspuffer resuspendiert. Dem Ansatz wurden 3 ml Toxinkonzentrat zugesetzt und dieser zwei Stunden bei 20 C und 90 Upm inkubiert.

2.24.3 Zellfraktionierung

Die toxinbehandelten Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 2.000 Upm), mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Dounce Homogenisators auf Eis. Zur Vermeidung des Proteinabbaus erfolgten alle folgenden Zentrifugationsschritte bei 4°C und die erhaltenen Pellets wurden sofort bei –20°C eingefroren. Das Pellet P1 (Zelltrümmer und Zellwände) wurde durch Zentrifugation des Lysates bei 300 g für fünf Minuten erhalten. Der Überstand wurde bei 13.000 g für 20 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 zentrifugiert, um die Membranfraktion P2 (Zytoplasmamembran, Vakuole Endosomen, Mitochondrien) zu erhalten. Anschließend wurde eine Zentrifugation bei 100.000 g des erneut entstandenen Überstandes für eine Stunde in der Ultrazentrifuge (Beckman L7; Rotor SW-55) durchgeführt. Das entstandene Pellet P3 enthielt Bestandteile des Golgi-Apparates, der Endosomen und Vesikel. Der nach Ultrazentrifugation erhaltene Überstand (zytosolische Fraktion) wurde über Nacht bei –20°C mit dem zweifachen Volumen an 100%-igem Ethanol gefällt, bei 4°C und 10.000 Upm abzentrifugiert und die Pellets in A. bidest. aufgenommen.

2.25 Protein-Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses von Natriumlaurylsulfat elektrophoretisch aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. In der vorliegenden

Arbeit wurden 10%-ige Tris/Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem verwendet, die sich zur Auftrennung von Proteingemischen von 5-60 kDa eignen (Asubel *et al.*, 1995). Auf die Verwendung eines Sammelgels konnte verzichtet werden. Die Herstellung der Gele erfolgte in einer „Mini-Protean II Multi-Casting Chamber“ der Firma BioRad.

Tris-Tricin-Gel

30% Acrylamid/	10	%
0,8% Bisacrylamid		
Tris-HCl/SDS, pH 8,45	3	%
H ₂ O _{steril}	4,3	%
Glycerin	10	%
10% APS	0,05	%
TEMED	0,2	%

Die Ansätze wurden vor der Auftrennung mit einem Fünftel (bezogen auf das Probenvolumen) an Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Als Standard diente der „Rainbow-Marker RPN 800“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

2.26 Western-Blot-Analyse

Der „Western Blot“ bezeichnet eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine nach der Fixierung auf einer Membran immunologisch nachgewiesen werden (Burnette, 1981).

2.26.1 „Semi-dry-blotting“

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das SDS-Gel für 15 Minuten in kaltem Transferpuffer äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Parallel dazu wurde eine PVDF-Membran für 2 Minuten in 100%-igem Methanol getränkt, um sie später mit wässrigen Lösungen benetzen zu können. Anschließend wurde die Membran in kaltem Transferpuffer gewaschen. Der Transfer der im Gel enthaltenen Proteine erfolgte durch Elektroblothing für 1,5 Stunden und einer Stromstärke von 1 mA/cm²

Gelfläche unter Verwendung einer „Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell“ der Firma BioRad auf die PVDF-Membran.

2.26.2 Immundetektion

Die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde über Nacht in 50 ml Blockingpuffer blockiert, um alle unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran zu maskieren und eine unspezifische Hybridisierung zu vermeiden. Nach dem Dekantieren des Puffers wurde die Membran eine Stunde mit der primären Antikörperlösung (primärer Antikörper in 10 ml Blockingpuffer, siehe Tabelle 7) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 50 ml Waschpuffer wurde die Membran mit der sekundären Antikörperlösung (sekundärer Antikörper in 10 ml Blockingpuffer, siehe Tabelle 7) erneut für eine Stunde inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die Membran zur Entfernung von Tween für 15 Minuten mit 50 ml TBS-Puffer gespült. Die gewünschten Proteine wurden innerhalb weniger Minuten durch Zugabe von NBT/BCIP in einer Verdünnung von 1.500 in Färbelösung nachgewiesen. Vor dem Trocknen wurde die Farbreaktion durch Spülen mit A. dest. gestoppt.

Tabelle 7: Bei der Immundetektion eingesetzte primäre und sekundäre Antikörper und deren Verdünnungen

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft
Anti-K28- β	polyklonaler Antikörper gegen K28 β aus Kaninchen	1:1.000	Labor M.J.Schmitt
Anti-GFP	monoklonaler Antikörper aus der Maus	1:2.000	Roche
Anti-cmyc	monoklonaler Antikörper aus der Maus	1:4.000	Roche
Anti-Ubiquitin	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen	1:1.000	Sigma
Anti-PDI	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen 55,3 kDa	1:5000	J. Winther
Anti-Sec61	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen 53 kDa	1:5.000	R. Sheckman
Anti-Pma1	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen 99kDa	1:1.000	R. Kölling
Anti-Kar2	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen 75 kDa	1:10.000	R. Sheckman
Anti-PGK	monoklonaler Antikörper aus der Maus 44kDa	1:250	Molecular Probes
Anti-Rabbit	monoklonaler, sekundärer Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege, AP-markiert	1:3.000	Sigma
Anti-Mouse	monoklonaler, sekundärer Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege, AP-markiert	1:3.000	Sigma

2.27 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation ist es möglich, Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in einem komplexen Proteingemisch nachzuweisen. Dazu wird einem Zelllysat der spezifische Antikörper im Überschuss zugesetzt und die Antigen-Antikörperkomplexe werden anschließend mit Protein-A-Sepharose ausgefällt. Die Protein-Interaktionen können nach mehreren Waschschritten und Elution durch SDS-PAGE analysiert werden.

Die Immunpräzipitation wurde in sogenannten „spin columns“ (ProbeQuant G-50 der Firma Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt (Brymora *et al.*, 2001).

2.27.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden mit 1 µg Antikörper versetzt, mit Lysepuffer auf 0,5 ml Endvolumen aufgefüllt und für 90 min bei 4°C invertiert. Zur Entfernung von unspezifischen Aggregaten wurden die Ansätze für 10 min bei 4°C und Höchstgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt.

2.27.2 Immunpräzipitation

Den Ansätzen wurden jeweils 50 µl Protein-A- Sepharose (Roche) zugefügt, diese erneut für 60 min bei 4°C invertiert und anschließend in „spin Columns“ überführt. Die Proben wurden abzentrifugiert (30 sec; 1.000 Upm; 4°C) und drei Mal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Proben wurden mit Tris/Tricin-Probenpuffer versetzt, kurz aufgeköcht und sofort für die SDS-PAGE verwendet.

2.28 Mikroskopie

Die Mikroskopie erfolgte mit einem Olympus BX-51 Forschungsmikroskop. Die Dokumentation wurde mit einer Digitalkamera (Olympus C3030-Z) und

die Auswertung mit der analySIS 3.0 Doku-Software (SIS) mit Fluoreszenz-Modul FIP durchgeführt.

2.28.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern dient zur Lokalisation und Funktionsprüfung zellulärer Proteine. Zum Einsatz kam hierbei eine Methode nach Roberts *et al.* (1991).

Fixierung der Zellen vor der Immunfluoreszenzmikroskopie

10 ml Hefekultur wurden bis zum Erreichen einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml in entsprechendem Medium kultiviert. Der Kultur wurden 1,2 ml 37%iges Formaldehyd zugefügt und für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in 2ml 1xFixative resuspendiert und über Nacht insgesamt 16 Stunden leicht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Zellen wurden dann bei 6.000 Upm für fünf Minuten (Raumtemperatur) zentrifugiert, in 1 ml TEB-Puffer aufgenommen und zehn Minuten bei 30°C leicht geschüttelt. Danach wurden sie erneut zentrifugiert (6.000 Upm, 5 min, Raumtemperatur) und das Pellet wurde in 1 ml SPM-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung der Zellwand wurden 25µl Glusulase und 15 µl Zymolyase (40 mg/ml-Zymolyase 20T in SPM-Puffer) zugegeben und die Ansätze unter leichtem Schütteln bei 30°C für 30-60 min inkubiert. Die fixierten Sphäroplasten wurden anschließend pelletiert (4.000 Upm, 5 min, Raumtemperatur) und in 1 ml 1,2M Sorbit gewaschen. Danach wurde jeder Ansatz in 500 µl 1,2 M Sorbit (4% SDS) aufgenommen, zwei Minuten inkubiert und bei 4.000 Upm 30 Sekunden zentrifugiert. Zum Abschluss wurden die Zellen zweimal mit 1 ml 1,2 M Sorbit gewaschen und schließlich in 1 ml Sorbit aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Antikörper-Bindung an die fixierten Zellen

Frisch hergestellte, fixierte Zellen (40 µl) wurden auf den Polylysin-beschichteten Objektträger aufgebracht und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Probe dreimal mit 20 µl PBS/BSA-Puffer gewaschen. Erneut wurden 20 µl PBS/BSA-Puffer zugegeben und in einer feuchten Kammer (Petri-Schale mit

nassem Papiertuch) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde wieder abgenommen und 10 µl des primären Antikörpers (1:10 Verdünnung in PBS/BSA-Puffer) zugefügt. Danach wurden die Objektträger eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert, die Flüssigkeit dann erneut abgenommen und die Proben sechsmal mit PBS/BSA-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 10 µl des sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpers (1:10 Verdünnung in PBS/BSA-Puffer) zugegeben und die Objektträger eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Die Flüssigkeit wurde erneut abgenommen und die Proben wurden neunmal mit PBS/BSA-Puffer gewaschen. Auf die Objektträger wurde ein Deckglas aufgesetzt, so dass die Proben zur Mikroskopie eingesetzt werden konnten.

2.28.2 Primäre und sekundäre Antikörper zur Fluoreszenzmikroskopie

1°Antikörper	2°Antikörper	Quelle
c-myc	Goat anti-Mouse IgG-FITC (490/520)	Calbiochem
Sec61	Goat anti-Rabbit IgG- Alexa Fluor 546 (556/573)	Molecular Probes/Invitrogen
Pma1	anti-rabbit IgG-Alexa Fluor546 (556/573)	Molecular Probes/Invitrogen

2.28.3 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie FITC- und GFP-markierter Proben wurden eine Anregungswellenlänge von 490 nm und ein Filter mit einem Emissionsspektrum von 515-550 nm verwendet.

Zur Fluoreszenzmikroskopie von mit DAPI angefärbten Proben wurde eine Anregungswellenlänge von 358 nm und ein Filter mit einem Emissionsspektrum von 450-550 nm verwendet.

Zur Fluoreszenzmikroskopie Alexa-Fluor-546-markierter Proben wurde eine Anregungswellenlänge von 556 nm und ein Filter mit einem Emissionsspektrum von 575-645 nm verwendet.

2.28.4 Differentieller Interferenz-Kontrast (NORMARSKI)

Zur Durchführung von NORMARSKI-Aufnahmen wurden die Zellen unter differentiellem Interferenzkontrast (DIC) und den entsprechenden Einstellungen betrachtet.

2.29 Chemikalien, Enzyme und Kits

2.29.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Roche bezogen.

2.29.2 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien von der Firmen Roth bzw. AppliChem bezogen.

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
Biozym, Hameln	Agarose, Sequagel [®] XR
Difco, Detroit	YNB ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat
MARCOR, New Jersey	Hefeextrakt, Agar-Agar

2.29.3 Molekularbiologische Standards und Kits

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Kits

Hersteller	Kits
Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire	Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“
PeqLab, Erlangen	„E.Z.N.A. \Plasmid-Miniprep-Kit!“
Eppendorf, Hamburg	„Perfectprep® Gel Cleanup Kit“
Invitrogen, Karlsruhe	„TOPO TA Cloning Kit“

3 Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse gliedern sich inhaltlich in drei Untersuchungsschwerpunkte. Diese umfassen die endozytotische Aufnahme und den intrazellulären Transport, die ER-Zytosol-Translokation und die Ubiquitinierung des K28-Toxins in der Hefe *S. cerevisiae*.

3.1 Untersuchungen zur endozytotischen Aufnahme und zum intrazellulären Transport des K28-Toxins in sensitiven Hefezellen

3.1.1 Differentielle Zentrifugation und Nachweis der Organellenspezifischen Verteilung durch Markerproteine

Zum Nachweis und zur Lokalisation von K28 in einer toxinbehandelten Hefezelle wurde die Zellfraktionierung mit anschließender differentieller Zentrifugation nach einem Protokoll von Seaman *et al.* (1988) durchgeführt (siehe 2.24). Dabei werden vier verschiedene Fraktionen erhalten, die je nach Dichte in verschiedenen Organellenbestandteilen angereichert sind. Die erste Fraktion (P1), die reich an hochmolekularem Material ist, enthält vor allem nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer. Da in dieser Fraktion so gut wie alle Bestandteile der Zelle nachweisbar sind, wurde auf die Darstellung dieser Fraktion fast immer verzichtet. Die zweite Fraktion (P2), auch als Membranfraktion bezeichnet, enthält Bestandteile der Zytoplasmamembran, vakuoläre Membranen, ER-Membranen und Mitochondrien. Die dritte Fraktion (P3) ist angereichert an Vesikeln, Golgi Membranen und Endosomen. Im verbleibenden Überstand (C) der dritten Fraktion befinden sich alle Proteine des Zytosols. Um die genaue Verteilung der Organellen bei dieser Art der Zellfraktionierung nachzuweisen, wurden Antikörper gegen verschiedene Markerproteine eingesetzt.

Zur Lokalisation der Zytoplasmamembran wurde die Membran-ATPase Pma1p (99 kDa) nachgewiesen, welche ausschließlich in der

Membranfraktion P2 detektiert werden konnte. Als Marker für Vesikel und Golgi-Apparat diente Vps10p, ein 180kDa großes Membranprotein des späten Golgi, welches sowohl in der Membranfraktion P2 als auch in der Vesikelfraktion P3 nachweisbar ist. Die Carboxypeptidase Y, ein 61 kDa großes Protein des vakuolären Lumens, konnte in allen Fraktionen detektiert werden. Das integrale ER-Membranprotein Sec61p (53 kDa) wurde ausschließlich in der Membranfraktion P2 nachgewiesen. Als zytosolischer Marker diente die Phosphoglyceratkinase (PGK, 44 kDa), ein Enzym der Glykolyse, welches in allen Fraktionen nachweisbar war.

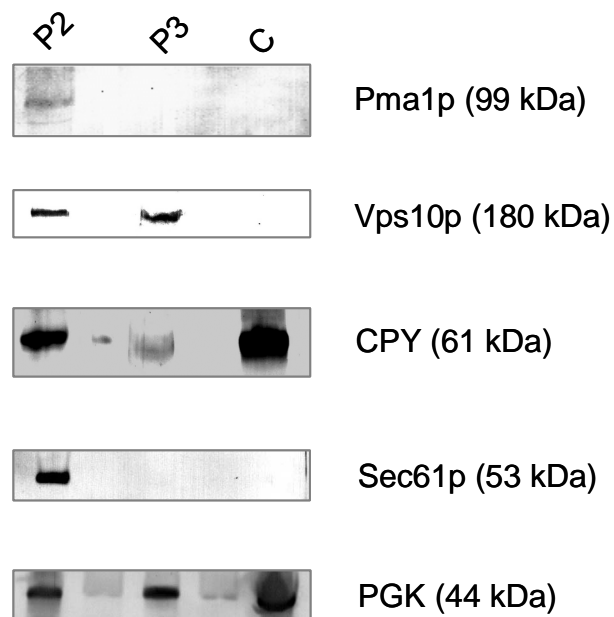


Abbildung 2: Nachweis zellulärer organellen-spezifischer Markerproteine nach differentieller Zentrifugation durch Western-Blot-Analyse.

Zellen des Hefestammes *S. cerevisiae* RH448 wurden wie in Punkt 2.24 beschrieben behandelt, aufgeschlossen und einer differentiellen Zentrifugation unterzogen (P1: Zelltrümmerfraktion nicht dargestellt, P2: Membranfraktion, P3: Vesikelfraktion, C: zytosolische Fraktion). Die erhaltenen subzellulären Fraktionen wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte über spezifische Antikörper gegen Pma1p, Vps10p, CPY, Sec61p und PGK.

3.1.2 Untersuchungen zur Identifizierung des HDEL-Rezeptors Erd2p als Plasmamembranrezeptor des viralen K28-Toxins

Der HDEL-Rezeptor Erd2p ist in der Hefe für das „retrieval“ von Proteinen aus dem Golgi zurück ins ER verantwortlich. Es handelt sich hierbei um ein im Golgi-Apparat ansässiges Membranprotein, das in der Lage ist das Tetrapeptid HDEL am C-Terminus von Proteinen als ER-Retentionssignal zu erkennen (Pelham *et al.*, 1988). Für das K28-Toxin, welches ebenfalls am C-Terminus ein HDEL-Motiv trägt, konnte bereits der Einfluss des Erd2p-Rezeptors am retrograden Transport des Toxins nachgewiesen werden (Eisfeld *et al.*, 2000; Riffer *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Dissertationsarbeiten von Katrin Eisfeld und Jenny Spindler legen jedoch die Vermutung nahe, dass das HDEL-Motiv des Toxins und somit der Erd2p-Rezeptor nicht nur für den retrograden Transport, sondern auch für die endozytotische Aufnahme des Toxins verantwortlich sein könnte (Eisfeld, 2001; Spindler, 2004). Um diese Vermutung experimentell näher zu untersuchen, sollte das Erd2-Protein fluoreszenzmikroskopisch unter unterschiedlichen Bedingungen in der Zelle lokalisiert werden. Hierzu sollten Erd2p-Fusionsproteine mit C-terminal anfusioniertem GFP bzw. mit C-terminalem c-Myc-Tag hergestellt werden, um das Protein in der Zelle über Fluoreszenzmikroskopie oder Koimmunfluoreszenz nachweisen zu können. Zusätzlich sollte durch Toxin-Aufnahmestudien geklärt werden, ob eine Δ *erd2* Mutante noch in der Lage ist, Toxin endozytotisch aufzunehmen.

3.1.2.1 Konstruktion eines Hefevektors zur induzierbaren Expression der Fusionsgene Erd2/cmyc und Erd2/GFP

Bei dem Hefe-Expressions-Vektor pESC-TRP handelt es sich um einen 6,5 kb großen Shuttle-Vektor. Der 2 μ -Vektor besitzt zwei MCS, die erlauben, das inklonierte Gen unter der Kontrolle des hefeeigenen *GAL1*- oder *GAL10*-Promotors zu exprimieren.

Zur Konstruktion des Fusionsgens Erd2/cmyc wurde das *ERD2*-Gen, inklusive des in ihm enthaltenen Introns, aus genomischer DNA des Stammes *S. cerevisiae* SEY6210 mittels der Primer 5'-*erd2* und 3'-*erd2cmyc*

amplifiziert. Dabei wurde durch den 3'-Primer das c-Myc-Epitop, welches als „Tag“ zur Erkennung durch monoklonale Antikörper dient, an das 3'-Ende von *ERD2* angefügt.

Zur Konstruktion des *ERD2*/GFP-Fusionsgens wurde eine SOE-PCR durchgeführt (siehe 2.16.1). Hierbei wurde in einem ersten PCR-Schritt das *ERD2*-Gen mit den Primern 5'-erd2 und 5'-GFP-3'-erd2 aus genomischer DNA des Stammes *S. cerevisiae* SEY6210 amplifiziert und das GFP-Gen mit Hilfe der Primer 5'-GFP-3'-Erd2 und 3'-GFP aus dem Template pαGFP^H hergestellt. In einem zweiten PCR-Schritt wurden die zwei PCR-Produkte durch die Primer 5'-erd2 und 3'-GFP miteinander fusioniert.

Die amplifizierten Konstrukte *ERD2*/cmyc und *ERD2*/GFP wurden nach der Kontrolle im Agarosegel in den Vektor pCR2.1-TOPO über TA-Klonierung eingefügt und zur Überprüfung auf Mutationen sequenziert (siehe 2.21). Amplifikate mit korrekter Sequenz wurden als *EcoRI*/*Bgl*II-Fragmente in den zuvor mit den selben Enzymen restringierten Vektor pESC-TRP in die MCS1 unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL10*-Promotors einkloniert, so dass die beiden Expressionsvektoren p*ERD2*^{GFP} und p*ERD2*^{cmyc} entstanden (Abbildung 3).

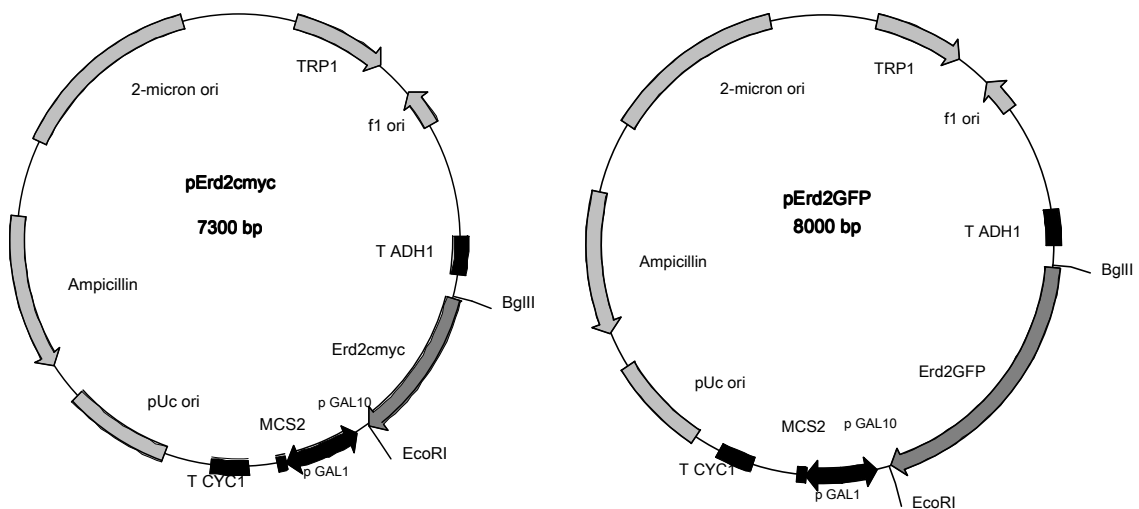


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Hefeexpressionsvektoren pERD2^{GFP} und pERD2^{cmyc}.

In den Grundvektor pESC-TRP (Fa. Stratagene) wurden die Fusionsgene ERD2/GFP und ERD2/cmyc als *EcoRI/BglII*-Fragmente in die MCS1 unter der Kontrolle des hefeeigenen, induzierbaren *GAL10*-Promotors kloniert. (Ries, 2004).

3.1.2.2 Funktionalitätsnachweis der Fusionsproteine ERD2/cmyc und ERD2/GFP im pESC-TRP-Expressionssystem durch Toxinsensitivitätsstudien

Die Funktionalität der Fusionsproteine ERD2/GFP und ERD2/cmyc sollte über Toxinsensitivitätsstudien nachgewiesen werden. Eine direkte Transformation der Fusionsgene-tragenden Plasmide in die Δ *erd2* Mutante YA12 war aufgrund der Selektionsmarker nicht möglich. Von Riffer *et al.* (2002) konnte bereits gezeigt werden, dass eine plasmidgetriebene Überexpression von *ERD2* zu einer gesteigerten Sensitivität des exprimierenden Stammes gegen K28-Toxin führt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und um die Funktionalität der Fusionsproteine ERD2/GFP und ERD2/cmyc nachzuweisen, wurden Zellen des Toxin-sensitiven Stammes *S. cerevisiae* SEY6210 mit dem, das Wildtyp-*ERD2*-Gen tragenden Vektor pYSCE bzw. den Vektoren pERD2^{GFP} und pERD2^{cmyc} transformiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein, mit dem Grundvektor transformierter Stamm bzw. der untransformierte Wildtyp. Die transformierten Stämme

wurden daraufhin im Methylenblau-Agar-Diffusionstest auf ihre Sensitivität gegenüber einem K28-Toxinkonzentrat untersucht (siehe 2.9.2). Dabei zeigte sich im Einklang mit den Ergebnissen von Riffer *et al.* (2002), dass die Überexpression von Erd2p durch den Vektor pYSCE im Stamm SEY6210 zu einem um 5 mm gesteigerten Hemmhof auf Leu d/o-Methylenblau-Agar im Gegensatz zur Kontrolle, dem untransformierten Stamm SEY6210 auf Minimal-Methylenblau-Agar, führte (

Abbildung 4). Anhand der ermittelten Eichgerade (siehe 2.10) kann gefolgert werden, dass die Überexpression von *ERD2* zu einer Steigerung der *in vivo* Sensitivität des Stammes SEY6210 um das Siebenfache führte (siehe Anhang Abbildung 42).

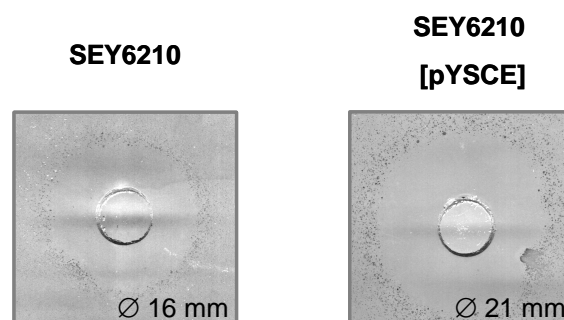


Abbildung 4: Steigerung der Toxin-Sensitivität von *S. cerevisiae* SEY6210 durch Transformation mit pYSCE und Überexpression von ERD2.

Der Wildtypstamm SEY6210 wurde mit dem *ERD2* exprimierenden 2 μ -Vektor pYSCE transformiert und im Agardiffusionstest (Leu d/o-MBA pH 4,7) im Vergleich zum nicht transformierten Wildtyp (Minimal-MBA pH 4,7) auf K28-Toxinsensitivität überprüft und diese als Hemmhofdurchmesser [Ø] angegeben (Ries, 2004)

Die Expression der Fusionsproteine ERD2/cmyc und ERD2/GFP ergaben unter induzierenden Bedingungen eine deutliche Vergrößerung der Hemmhöfe um 5 mm bzw. um 8 mm im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle (siehe Abbildung 5). Die Sensitivität des Stammes SEY6210 konnte also durch Überexpression des Erd2p^{cmyc} um das 1,8-fache und durch Erd2p^{GFP} um das 6-fache gesteigert werden (siehe Anhang Abbildung 43).

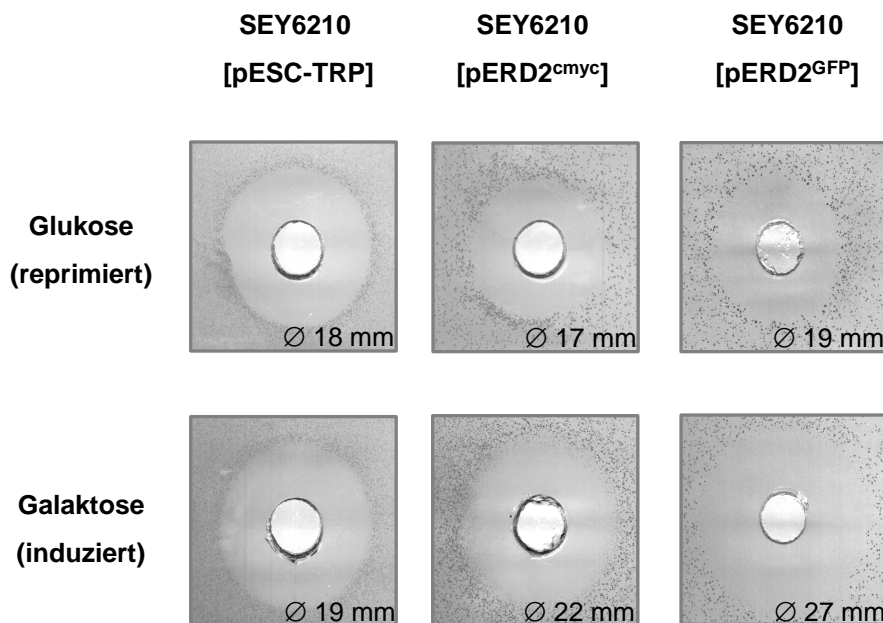


Abbildung 5: Steigerung der Toxin-Sensitivität von *S. cerevisiae* SEY6210 durch ERD2/cmyc- und ERD2/GFP-Überexpression.

Der Stamm SEY6210 wurde mit den Vektoren pERD2^{cmyc} und pERD2^{GFP} transformiert und im Agardiffusionstest (Trp d/o-MBA pH 4,7) im Vergleich zu dem, mit dem Grundvektor pESC-TRP transformierten Stamm unter reprimierenden und induzierenden Bedingungen auf K28-Toxinsensitivität überprüft und diese als Hemmhofdurchmesser [Ø] angegeben (Ries, 2004).

In Abbildung 6 sind die Veränderungen der relativen Toxinsensitivitäten, die durch die Überexpression der verschiedenen Erd2p-Derivate hervorgingen nochmals zum Vergleich gegenübergestellt.

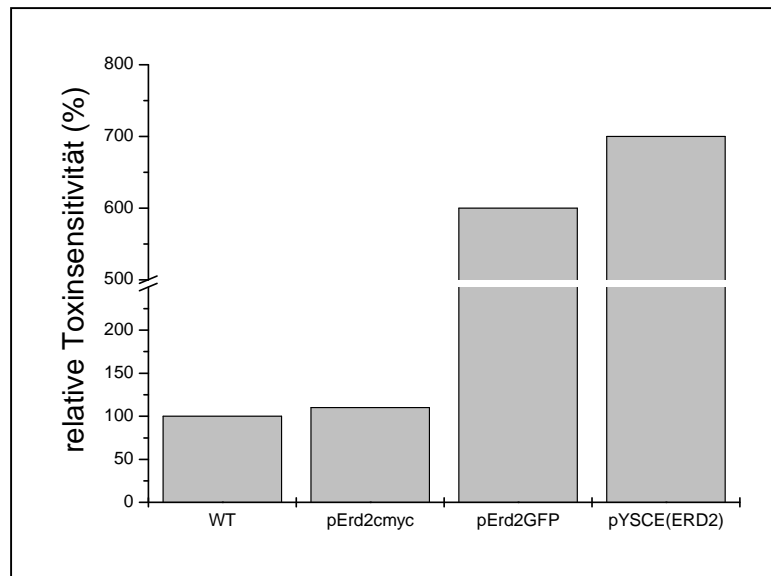


Abbildung 6: Veränderung der relativen Sensitivitäten gegen K28-Toxin bei Überexpression verschiedener *ERD2*-Derivate

Dargestellt sind die relativen Toxinsensitivitäten des Stammes SEY6210, transformiert mit den Vektoren pERD2^{cmyc}, pERD2^{GFP} und pYSCE(*ERD2*) im Vergleich zum untransformierten bzw. mit dem Leervektor transformiertem Stamm. Die Werte wurden aufgrund der ermittelten Eichgeraden (siehe Anhang Abbildung 42 und Abbildung 43) bestimmt. 100% relative Toxinsensitivität entsprechen einem im MBA-Test erhaltenen Hemmhof von 16 mm (Glucose) und 19 mm Galaktose.

Da die Expression des Erd2p^{GFP} wie die Expression des unmodifizierten Erd2p eine in etwa gleiche Steigerung der Toxinsensitivität zur Folge hatte, konnte eine Funktionalität des Fusionsproteins angenommen werden. Da jedoch die Expression der cmyc-markierten Erd2p-Variante keine signifikante Steigerung der Sensitivität des Wildtyp-Stammes zur Folge hatte, d.h. keine Funktionalität des Proteins nachgewiesen werden konnte, wurde dieses Derivat nicht weiter verwendet. Stattdessen wurde zu weiteren Untersuchungen ein Vektor (JS209) benutzt, der eine intronlose Kopie des *ERD2*-Gens aus *S. cerevisiae* mit C-terminalem c-Myc-Tag besaß. Die Funktionalität dieses *ERD2*-Konstruktes wurde bereits von Semenza *et al.* nachgewiesen (Semenza *et al.*, 1990).

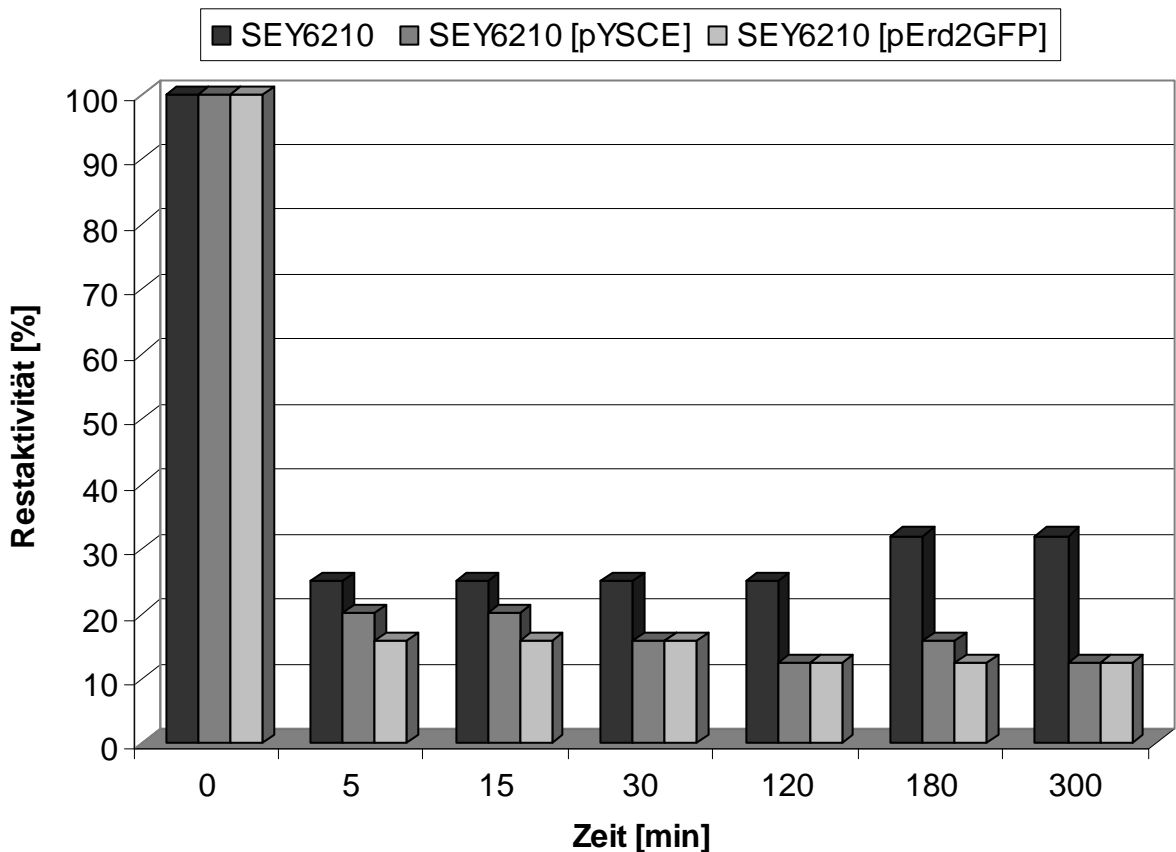
3.1.2.3 Toxinaufnahmestudien an Erd2p-überexprimierenden Wildtypstämmen und einer Δ erd2 Mutante

Sollte es sich bei Erd2p um den Plasmamembranrezeptor handeln, so sollte die Menge an vorhandenem HDEL-Rezeptor in der Zelle einen Einfluss auf die Menge des aufgenommenen Toxins haben.

Um diese Annahmen experimentell zu untersuchen wurden intakte Zellen des Stammes SEY6210, transformiert mit den Plasmiden pYSCE und pErd2^{GFP}, wie unter 2.12 beschrieben mit Toxinkonzentrat bei 20°C behandelt. Als Kontrolle diente der untransformierte Wildtypstamm. Die Bestimmung der Toxinmenge, die über rezeptorvermittelte Endozytose von den Hefezellen aufgenommen wurde, erfolgte indirekt, indem die verbliebene Menge an Toxin (Restaktivität) im zellfreien Überstand mittels Agardiffusionstest gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d bestimmt wurde. Hierzu wurde die Restaktivität des verbliebenen Toxins im Überstand im MBA-Test mit Hilfe der, für den Stamm 192.2d gegen K28-Toxinkonzentrat ermittelten Eichgerade (siehe 2.10 sowie Anhang Abbildung 44), bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst dargestellt. Dabei wird deutlich, dass Hefen, in denen Erd2p zusätzlich zum zelleigenen Erd2p plasmidgetrieben überexprimiert vorlag, über die Zeit in der Lage waren, deutlich mehr Toxin aufzunehmen, was sich in einer geringeren verbliebenen Restaktivität ausdrückte. So zeigte der untransformierte Stamm SEY6210 bereits nach 5 Minuten nur noch eine Restaktivität des Toxins von etwa 25% im Überstand, die im Verlauf des Versuches konstant blieb bzw. sich zu dessen Ende hin noch einmal erhöhte, was sehr wahrscheinlich auf Messungenauigkeiten bei der Auswertung der Hemmhofgrößen zurückzuführen ist. Hefen, die zusätzlich zu dem zelleigenen Erd2p noch Erd2p bzw. Erd2p^{GFP} exprimierten, zeigten nach 5 minütiger Toxininkubation nur noch Restaktivitäten von etwa 20% bzw. 15%. Zum Ende des Versuches hin nahmen diese Restaktivitäten weiter bis auf 12% ab. Dies zeigt, dass die Überexpression von Erd2p zusätzlich zum zelleigenen Erd2p bei Hefen zu einer gesteigerten Toxin-Aufnahme führt und

dass die betreffenden Hefen selbst nach mehrstündiger Inkubation mit Toxin noch in der Lage sind, weitere Mengen an Toxin aufzunehmen.

Abbildung 7: Bestimmung der Restaktivität von K28-Toxinkonzentrat nach



Aufnahmestudien an intakten Hefen des Stammes SEY6210 vor und nach Expression unterschiedlicher Erd2p-Derivate

Hefezellen des Stammes SEY6210, untransformiert bzw. transformiert mit den Plasmiden pYSCE und pErd2^{GFP} wurden wie in Punkt 2.12 beschrieben behandelt und über einen Zeitraum von 5 h bei 20°C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Die von den Hefezellen nicht aufgenommene Toxinmenge wurde als Restaktivität im Methylenblau-Agardiffusionstest gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d bestimmt und mit der für diesen Stamm ermittelten Toxin-Eichgerade errechnet (siehe Anhang Abbildung 44). 100% relative Toxinsensitivität entsprechen einem im MBA-Test erhaltenen Hemmhof von 16 mm.

Wird die Menge an vorhandenem Erd2p in einer Zellen erhöht, so ist diese in der Lage mehr K28-Toxin aufzunehmen. Da dieser Effekt auch durch einen, durch den HDEL-Rezeptor gesteigerten Transport vom Golgi ins endoplasmatische Retikulum ausgelöst werden könnte, stellt dies noch keinen Beweis für das Vorhandensein von Erd2p in der Plasmamembran dar. Darum sollte zusätzlich untersucht werden, ob eine $\Delta erd2$ Mutante überhaupt fähig ist, Toxin in die Zelle aufzunehmen. Mentges (1997) konnte bereits im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigen, dass sich eine $\Delta erd2$ Mutante (*S. cerevisiae* $\Delta YA12$) toxinresistent verhielt. Da eine $\Delta erd2$ Mutante aufgrund von strukturellen Defekten des Golgi-Apparates nicht lebensfähig wäre (Townsend *et al.*, 1994), wird der Defekt im Stamm $\Delta YA12$ durch die plasmidgetriebene Expression des *SEC12*-Gens supprimiert, welches am Abschnüren von Transportvesikeln vom ER beteiligt ist. Eine plasmidgetriebene Überexpression des *ERD2*-Gens führte dazu, dass die ursprünglich K28-resistente $\Delta erd2$ Mutante wieder eine deutliche Toxin-Sensitivität zeigte.

Um die Abhängigkeit der Toxinaufnahme durch Erd2p zu beweisen, wurden Toxinaufnahmestudien mit dem Stamm $\Delta YA12$, vor und nach Transformation mit dem Vektor pYSCE wie unter Punkt 2.12 beschrieben bei 20°C durchgeführt. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist, zeigte die $\Delta erd2$ Deletionsmutante nach 15 Minuten Inkubation mit Toxinkonzentrat immer noch eine Restaktivität an Toxin im Überstand von annähernd 80%, im Vergleich zum Erd2p-exprimierenden Stamm, der nur noch eine Restaktivität von etwa 30% zeigte. Die Restaktivität im Überstand der $\Delta erd2$ Deletionsmutante blieb über die gesamte Versuchsdauer konstant bei 80%, wohingegen die des rücktransformierten Stammes ($\Delta YA12[ERD2]$) auf etwa 25% abfiel. Der 20%ige Verlust an Toxinaktivität des Hefestammes $\Delta YA12$ kann auf die Bindung des Toxins an die Zellwand des Stammes zurückgeführt werden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass eine $\Delta erd2$ Mutante nicht mehr in der Lage ist, Toxin zu internalisieren, was

darauf schließen lässt, dass es sich bei Erd2p um den Plasmamembranrezeptor des K28-Toxins handelt.

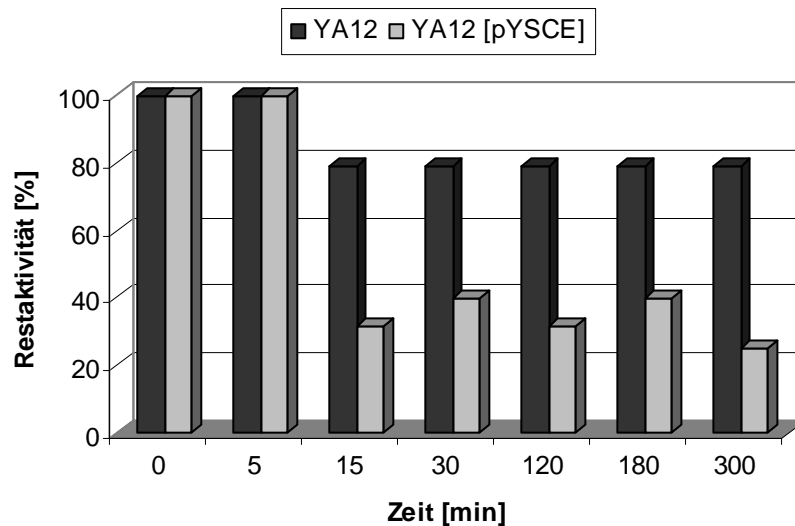


Abbildung 8: Bestimmung der K28-Restaktivität nach Toxin-Aufnahmestudien an intakten Hefen der Δ erd2 Mutante Δ YA12 vor und nach Transformation mit dem Erd2p exprimierenden Vektor pYSCE

Zellen der Δ erd2 Mutante vor und nach Transformation mit dem Erd2p-Expressionsvektor pYSCE wurden wie unter Punkt 2.12 beschrieben über einen Zeitraum von 5 h bei 20°C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Die von den Hefezellen nicht aufgenommene Toxinmenge wurde als Restaktivität im Methylenblau-Agardiffusionstest gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d bestimmt und mit der für diesen Stamm ermittelten Toxin-Eichgerade errechnet (siehe Anhang Abbildung 44). 100% relative Toxinsensitivität entsprechen einem im MBA-Test erhaltenen Hemmhof von 16 mm.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse noch einmal zusammenfassend dargestellt.

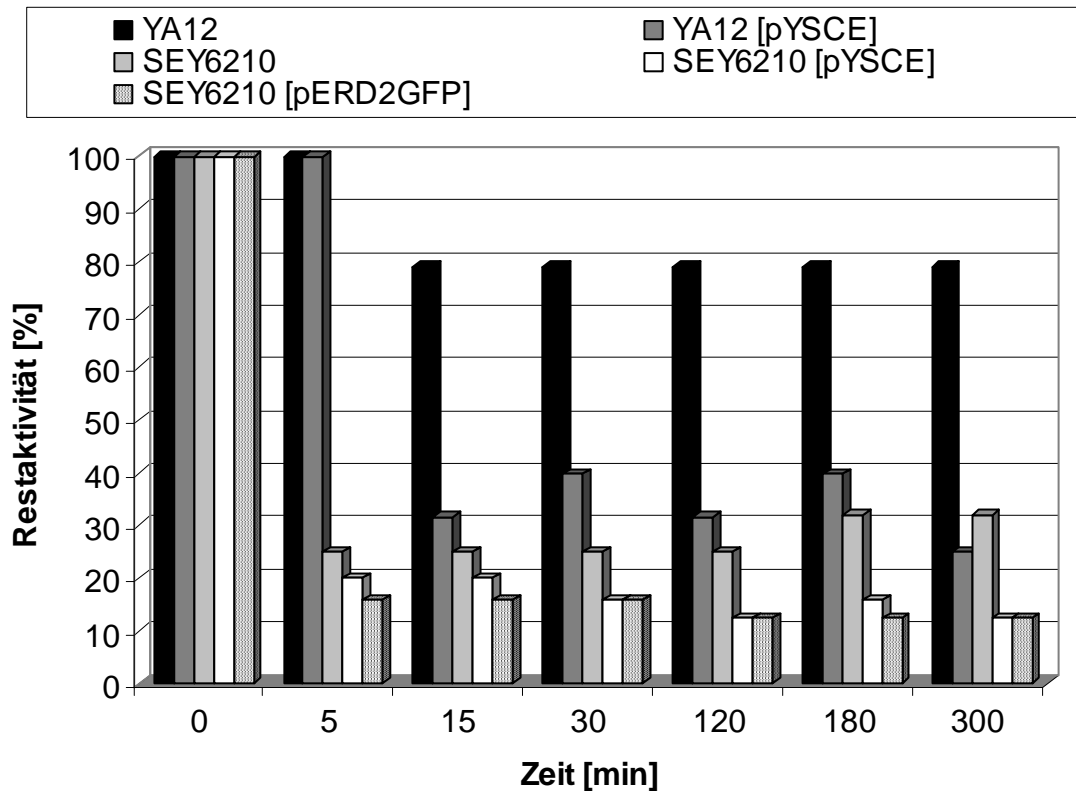


Abbildung 9: Bestimmung der K28-Restaktivität nach K28-Aufnahmestudien an intakten Hefen der $\Delta erd2$ Mutanten $\Delta YA12$ vor und nach Transformation mit dem Erd2p-Expressionsvektor pYSCE und an intakten Hefen des Stammes SEY6210 vor und nach Expression unterschiedlicher Erd2p-Derivate

Zellen des Stammes SEY6210 und der $\Delta erd2$ Mutante vor und nach Transformation mit dem Erd2p-Expressionsvektoren pYSCE bzw. pErd2^{GFP} wurden wie unter Punkt 2.12 beschrieben über einen Zeitraum von 5 h bei 20°C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Die von den Hefezellen nicht aufgenommene Toxinmenge wurde als Restaktivität im Methylenblau-Agardiffusionstest gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d bestimmt und mit der für diesen Stamm ermittelten Toxin-Eichgerade errechnet (siehe Anhang Abbildung 44). 100% relative Toxinsensitivität entsprechen einem im MBA-Test erhaltenen Hemmhof von 16 mm.

3.1.2.4 *In vivo* Lokalisation getaggtter Erd2p-Derivate

Zur *in vivo* Lokalisation von Erd2p wurden die Vektoren pERD2^{GFP} und JS209 in die entsprechenden Hefen transformiert und zur Lokalisation des Erd2/GFP-Fusionsproteins zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Als Kontrolle wurde der Grundvektor pESC mitgeführt. Mit diesem Vektor transformierte Zellen zeigten keine Fluoreszenz. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist zeigten Zellen, die das Fusionsprotein exprimierten, eine Fluoreszenz, die über die ganze Zelle verteilt war, bzw. intrazellulären Membransystemen zugeordnet werden konnte.

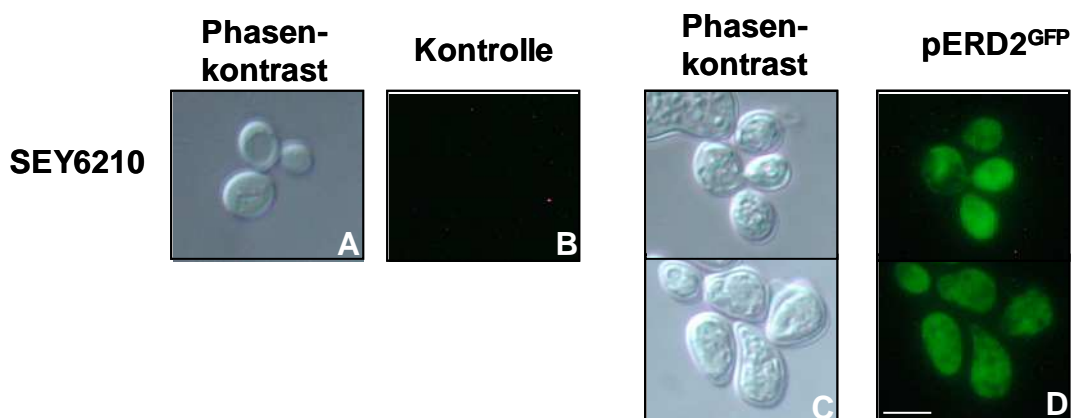


Abbildung 10: *In vivo* Lokalisation von Erd2p^{GFP} in der Hefe *S. cerevisiae* SEY6210

Die Expression der GFP-Fusion im Stamm SEY6210 wurde an exponentiell wachsenden Zellen mit einem Anregungs-/Emissionsfiltersystem von 488/527 nm analysiert (D). Als Negativkontrolle wurde der Stamm SEY6210 transformiert mit dem Grundvektor pESC mitgeführt (B). Der Balken entspricht 4 µm (Ries, 2004).

Die *in-vivo*-Detektion des ERD2/cmyc-Proteins wurde durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft. Hierzu wurden die Hefezellen fixiert und nach enzymatischer Entfernung der Zellwand mit einem monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper behandelt. Danach erfolgte eine Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper (siehe 2.28.1). Zur Kontrolle diente eine $\Delta erd2$ Mutante (YA12), die wie erwartet keine Fluoreszenz zeigte. Als Markerprotein wurde die Verteilung der Plasmamembran ATPase Pma1p untersucht, die eine für Plasmamembran-Proteine typische ringförmige Fluoreszenz zeigte. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die Erd2p^{cmyc} exprimierten eine über die ganze Zelle verteilte Fluoreszenz bzw. punktierte Strukturen, bei denen es sich um intrazelluläre Vesikel handeln könnte (siehe Abbildung 11).

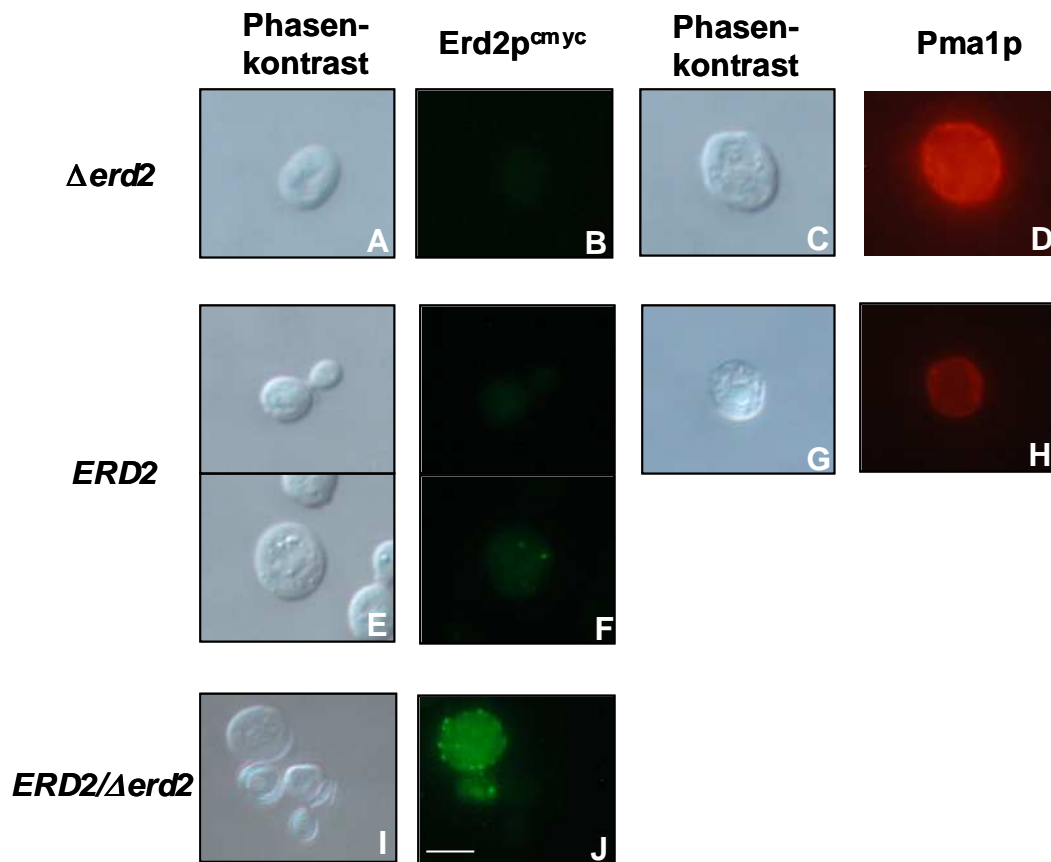


Abbildung 11: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von Erd2p^{cmyc} und Pma1p in einem ERD2-Wildtypstamm und einer heterozygot diploiden Erd2/Δerd2-Mutante

Der Wildtyp BY4742 und der diploide Stamm YBL040c (*ERD2/Δerd2*), die den Vektor JS209 (Erd2p^{cmyc}) enthielten wurden fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet (siehe 2.28.1). Die Zellen wurden mit Antikörpern, gegen das cmyc-Epitop (F, J) bzw. gegen Pma1p (H) behandelt und ebenfalls im Phasenkontrast mikroskopiert (E, G, I). Zur Kontrolle des cmyc-Antikörpers wurde der Stamm YA12 (*Δerd2*) parallel mitgeführt (A-D). Der Balken entspricht 4 μm.

Falls Erd2p infolge von intrazellulärem Transport die Plasmamembran erreichen sollte, müsste zu erwarten sein, dass Erd2p in einer *end3* Mutante in der Plasmamembran akkumuliert. Eine *end3* Mutante weist Defekte in Schritten der frühen Endozytose auf, was zu Störungen bei der Bildung von endosomalen Vesikeln, der Ste2p-vermittelten Endozytose von α -Faktor, als auch der „fluid-phase“ Endozytose führt (Raths *et al.*, 1993). Die indirekte Immunfluoreszenz von Erd2p^{myc} wurde deshalb an einer *end3* Mutante (RH1623) und deren isogenem Wildtyp (RH448) durchgeführt. Als Kontrolle zur Lokalisation der Plasmamembran wurde erneut die Plasmamembran ATPase Pma1p fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Wie in Abbildung 12 zu sehen, zeigte der Wildtypstamm RH448 eine über die ganze Zelle verteilte Fluoreszenz des Erd2p^{myc}. Im Unterschied dazu war in der *end3* Mutante, eine für Plasmamembranproteine typische ringförmige Fluoreszenz vermittelt durch Erd2p^{myc}, zu erkennen, die der Lokalisation des Markerproteins Pma1p ähnelte. Damit konnte zum ersten Mal bei Hefezellen mit einem Defekt in der frühen Endozytose der HDEL-Rezeptor in der Plasmamembran nachgewiesen werden.

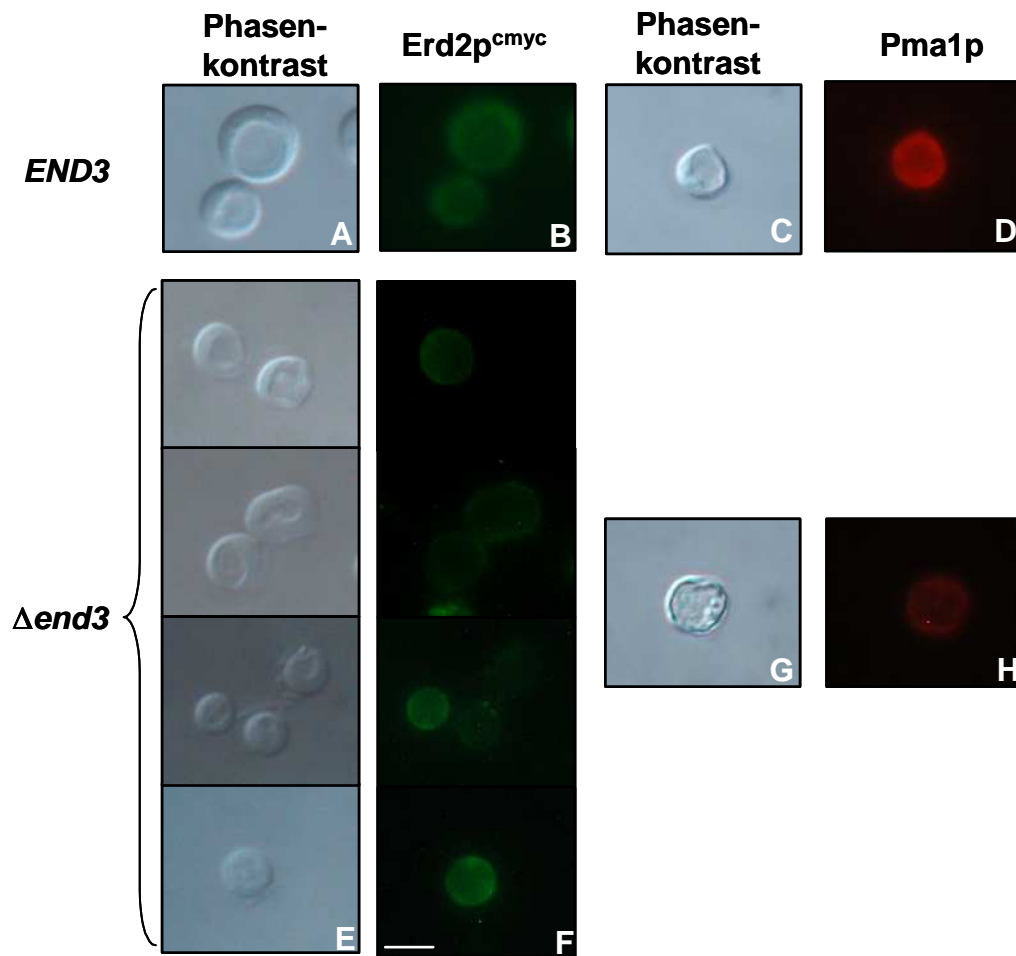


Abbildung 12: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation von Erd2p^{myc} und Pma1p in einem *END3* Wildtypstamm und einer *Δend3* Mutante

Der Wildtyp RH448 (*END3*) und die Mutante RH1623 (*Δend3*), die den Vektor JS209 (*ERD2^{myc}*) enthielten wurden fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet (siehe 2.28.1). Die Zellen wurden mit Antikörper gegen das c-Myc-Epitop (B, F) bzw. gegen Pma1p (D, H) behandelt und auch im Phasenkontrast mikroskopiert (A, E, C, G). Der Balken entspricht 4 μ m.

3.1.3 Untersuchungen zur Internalisierung des K28-Toxins durch sensitive Hefezellen

Um nähere Aufschlüsse darüber zu erhalten, wie die Internalisierung von K28-Toxins erfolgt und wie es ins Zytosol der Zelle gelangt, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die zum einen energieabhängige bzw. temperaturabhängige Toxinaufnahme sowie zum anderen die Aufnahme von K28 über azidische Vesikel experimentell adressierten (Haigis and Raines, 2003).

3.1.3.1 Internalisierung des K28-Toxins in sensitive Hefezellen in Abhängigkeit von der Temperatur

Der Einfluss der Temperatur auf die Toxin-Internalisierung wurde untersucht, indem Zellen des sensitiven Stammes RH448 wie unter Punkt 2.23 beschrieben vorbereitet und anschließend zwei Stunden mit K28-Toxinkonzentrat bei 20°C bzw. 4°C inkubiert wurden. An die differentielle Zentrifugation schloss sich eine Western-Analyse an, bei der die Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit einem gegen die β -Untereinheit von K28 gerichteten Antikörper detektiert wurden. In

Abbildung 13 ist zu sehen, dass das Toxin im sensitiven Stamm bei einer Inkubation bei 4°C nur in den Fraktionen P1 (Zellwand, Zelltrümmer) und P2 (Membranfraktion) nachweisbar war. Bei 20°C war das Toxin dagegen noch zusätzlich in der Vesikel-Fraktion und der zytosolischen Fraktion detektierbar. Die Resultate deuten darauf hin, dass die Internalisierung des K28-Toxins bei 4°C nicht stattfindet, sodass die Aufnahme durch einen endozytotischen Prozess erfolgen muss.

3.1.3.2 Internalisierung des K28-Toxins durch sensitive Hefezellen in Anwesenheit eines metabolischen Inhibitors (NaN₃)

Um zu überprüfen, ob der metabolische Inhibitor NaN₃ einen Einfluss auf die K28-Aufnahme in Hefezellen hat, wurde der entsprechend vorbereitete Stamm RH448 (siehe Punkt 2.22) zwei Stunden mit 10 mM NaN₃ bei 20°C und anschließend für weitere zwei Stunden mit K28-Toxin bei 20°C behandelt. Nach Zellaufschluss und differentieller Zentrifugation erfolgte die

Analyse der einzelnen Fraktionen im Western Blot mittels eines polyklonalen Anti- β -Antikörpers. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, war ein K28-Signal in Azid-behandelten Zellen nur in den Fraktionen P1 und P2 nachweisbar. Es kann daher angenommen werden, dass eine Präinkubation sensitiver Hefezellen mit einem metabolischen Inhibitor die Internalisierung des Toxins verhindert und dass die Toxinaufnahme Energie abhängig erfolgt.

3.1.3.3 Internalisierung des K28-Toxins in Abhängigkeit der schwachen Base NH_4Cl

Bei NH_4Cl handelt es sich um eine schwache Base, die in der Lage ist, den endosomalen pH-Wert zu erhöhen, wovon besonders späte Endosomen und Lysosomen betroffen sind.

Um den intrazellulären Weg des K28-Toxins bis ins Zytosol einer sensitiven Zielzelle genauer zu untersuchen, wurden deshalb Zellen des Stammes RH448 wie unter Punkt 2.22 angegeben behandelt und zwei Stunden mit 20 mM NH_4Cl inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Toxinkonzentrat zugegeben und die Zellen erneut bei 20°C für zwei Stunden leicht geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend aufgeschlossen und einer subzellulären Fraktionierung unterzogen (2.22.3). Durch Western Blot Analyse der subzellulären Fraktionen und der zytosolischen Fraktion konnte gezeigt werden, dass die Base NH_4Cl keinen Einfluss auf den intrazellulären Weg des Toxins hat, da es in allen Fraktionen nachweisbar war (siehe Abbildung 13). Diese Ergebnisse konnten zusätzlich durch Methylenblau-Agar-Diffusionstests bestätigt werden, bei denen der Zusatz von 20 mM, 30 mM bzw. 40 mM NH_4Cl keinen signifikanten Unterschied in der Größe des Hemmhofes des sensitiven Stammes 192.2d gegen K28-Toxinkonzentrat ergab (Ergebnisse nicht dargestellt).

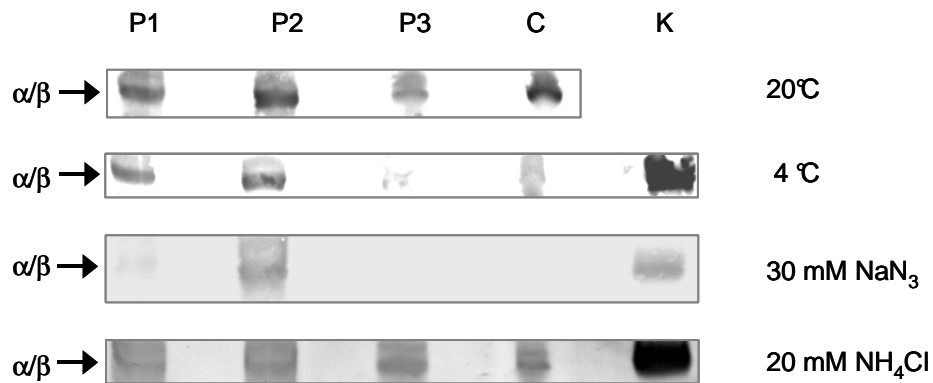


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Internalisierung von K28-Toxin in subzellulären Fraktionen der sensitiven Hefe RH448 in Abhängigkeit von der Temperatur, vom Energetisierungsgrad sowie vom pH-Wert.

Zum Nachweis der endozytotischen Toxin-Aufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur wurde der sensitive Hefestamm RH448 einer zweistündigen Inkubation mit Toxinkonzentrat bei 20°C und 4°C unterzogen. Zur Untersuchung der energieabhängigen Aufnahme bzw. der eventuellen Aufnahme des Toxins über azidische Vesikel wurden die Zellen mit 30 mM NaN₃ und 20 mM NH₄Cl zwei Stunden vorbehandelt und anschließend zwei Stunden mit Toxinkonzentrat inkubiert. Die durch differentielle Zentrifugation erhaltenen Fraktionen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mittels polyklonaler anti-β-Antikörper.

P1: Zellwand, Zelltrümmer

P2: Plasmamembran, ER-Membran, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Golgi-Membran, Transportvesikel, Endosomen

C: zytosolische Fraktion

K: K28-Toxinkonzentrat

3.1.4 Untersuchungen zur endozytotischen Toxin-Aufnahme und zum intrazellulären K28-Transport durch Screening von Deletionsmutanten

Um nähere Aufschlüsse über die an der endozytotischen Aufnahme und dem intrazellulären Transport des K28-Toxins beteiligten Proteine zu erlangen, wurde ein Mutantenscreening durchgeführt. Insgesamt wurden 348 individuelle Mutanten untersucht, die in Genen deletiert sind, deren Produktion laut Protein-Datenbank MIPS eine Funktion innerhalb des zellulären Transports zukommt (<http://mips.gsf.de>, „Functional Category 20: Cellular transport, transport facilitation and transport routes“).

Der Screen wurde auf Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar durchgeführt, auf dem der zugehörige Wildtypstamm BY4742 einen Hemmhof von 13 mm gegenüber K28-Toxin zeigte. Ein Phänotyp wurde bei Mutanten angenommen, die gegenüber K28-Toxin entweder keinen Hemmhof, einen Hemmhof kleiner als 10 mm oder größer als 16 mm zeigten. Dies entsprach einer Resistenz, einer etwa dreifach verminderten, oder einer zweifach erhöhten Sensitivität (siehe Eichgerade Anhang Abbildung 45).

Insgesamt zeigten 61 Mutanten von 352 (17,5%) einen Phänotyp. Davon zeigten 14 (4%) eine komplette Resistenz, 30 (8%) eine deutlich verminderte Sensitivität und 21 (6%) erwiesen sich als hypersensitiv gegen K28 (Tabelle 10, Tabelle 11, Tabelle 12). Eine Auflistung der Ergebnisse aller getesteten Mutanten befindet sich im Anhang (Tabelle 23).

Tabelle 10: Chromosomale Hefegene, deren Deletion eine Resistenz gegen K28-Toxin vermittelt

Die K28-Sensitivität der angegebenen Stämme wurde im Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar bestimmt. Informationen zur Funktion der deletierten Proteine wurden der Protein-Datenbank MIPS (<http://mips.gsf.de>) entnommen. (K28-Sensitivität des Wildtyps BY4742: 13 mm)

ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Hemmhof-Durchmesser [mm]
YBL007c	<i>SLA1</i>	cytoskeleton assembly control protein	0
YDR129c	<i>SAC6</i>	actin filament bundling protein, fimbrin	0
YDR372c	<i>VPS74</i>	similarity to hypothetical <i>S. pombe</i> protein	0
YGL167c	<i>PMR1</i>	Ca ⁺⁺ -transporting P-type ATPase located in Golgi	0
YGL206c	<i>CHC1</i>	clathrin heavy chain	0
YJR005w	<i>APL1</i>	AP-2 complex subunit, beta2-adaptin, 78 KD	0
YJR058c	<i>APS2</i>	AP-2 complex subunit, sigma2 subunit, 17 KD	0
YJR121w	<i>ATP2</i>	F1F0-ATPase complex, F1 beta subunit	0
YLL043w	<i>FPS1</i>	Glycerol channel of the plasma membrane	0
YLR337c	<i>VRP1</i>	verprolin	0
YNL084c	<i>END3</i>	required for endocytosis and cytoskeletal organization	0
YNL243w	<i>END4</i>	cytoskeleton assembly control protein	0
YOL062c	<i>APM4</i>	AP-2 complex subunit, mu2 subunit, 55 KD	0
YOR035c	<i>SHE4</i>	required for mother cell-specific gene expression	0

Tabelle 11: Chromosomale Hefegene, deren Deletion eine verminderte Sensitivität gegen K28-Toxin vermittelt

Die K28-Sensitivität der angegebenen Stämme wurde im Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar bestimmt. Informationen zur Funktion der deletierten Proteine wurden der Protein-Datenbank MIPS (<http://mips.gsf.de>) entnommen. (K28-Sensitivität des Wildtyps BY4742: 13 mm)

ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Hemmhof-Durchmesser [mm]
YAL026c	<i>DRS2</i>	P-type ATPase reported to act as an aminophospholipid translocase (flippase)	6
YBR171w	<i>SEC66</i>	ER protein-translocation complex subunit	5
YDL128w	<i>VCX1</i>	Vacuolar Ca ⁺⁺ /H ⁺ exchanger	10
YDL192w	<i>ARF1</i>	small GTP-binding protein of the ARF family	9
YDR335w	<i>MSN5</i>	multicopy supressor of snf1 mutation	6
YDR490c	<i>PKH1</i>	ser/thr protein kinases	9
YDR497c	<i>ITR1</i>	Inositol permease	6
YER031c	<i>YPT31</i>	GTP-binding protein of the rab family	10
YGL054c	<i>ERV14</i>	ER-derived Vesicles	9
YGR166w	<i>KRE11</i>	beta-glucan synthesis-associated protein	5
YHR064c	<i>SSZ1</i>	regulator protein involved in pleiotropic drug resistance	9
YIR004w	<i>DJP1</i>	DnaJ-like protein involved specifically in peroxisomal protein import	10
YJL093c	<i>TOK1</i>	Voltage-gated, outward-rectifying K ⁺ channel protein of the plasma membrane	10
YKL002w	<i>DID4</i>	class E vacuolar-protein sorting and endocytosis factor	9
YKL016c	<i>ATP7</i>	F1F0-ATPase complex, FO D subunit	10
YLR268w	<i>SEC22</i>	synaptobrevin (V-SNARE)	6
YLR370c	<i>ARC18</i>	subunit of the Arp2/3 complex	9
YML111w	<i>BUL2</i>	ubiquitin-mediated protein degradation	10
YMR109w	<i>MYO5</i>	myosin I	9
YNL101w	<i>AVT4</i>	involved in amino acid efflux from the vacuole	10

ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Hemmhof-Durchmesser [mm]
YNL142w	<i>MEP2</i>	High affinity ammonium permease - proposed role also as ammonium sensor involved in pseudohyphal growth	9
YNR006w	<i>VPS27</i>	vacuolar protein sorting-associated protein	9
YOR115c	<i>TRS33</i>	TRAPP subunit of 33 kDa involved in targeting and fusion of ER to golgi transport vesicles	9
YPL019c	<i>VTC3</i>	strong similarity to YFL004w, similarity to YJL012c	9
YPR009w	<i>SUT2</i>	similarity to sterol uptake protein Sut1p	10
YBLO047c	<i>EDE1</i>	EH domain protein involved in endocytosis through ubiquitin-dependent mebrane protein binding	7
YKL126w	<i>YPK1</i>	Ser/thr-specific protein kinase	5
YDR388w	<i>RVS167</i>	Reduced viability upon starvation protein	10
YFL025c	<i>BST1</i>	Negative regulator of COPII vesicle formation	9
YPR028w	<i>YOP1</i>	Ypt-interacting protein	10

Tabelle 12: Chromosomale Hefegene, deren Deletion eine Hypersensitivität gegen K28-Toxin vermittelt

Die K28-Sensitivität der angegebenen Stämme wurde im Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar bestimmt. Informationen zur Funktion der deletierten Proteine wurden der Protein-Datenbank MIPS (<http://mips.gsf.de>) entnommen. (K28-Sensitivität des Wildtyps BY4742: 13 mm)

ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Hemmhof-Durchmesser [mm]
YBR039w	ATP3	F1F0-ATPase complex, F1 gamma subunit	24
YBR068c	BAP2	Broad-specificity amino-acid permease - inducible by most neutral amino acids	21
YBR097w	VPS15	ser/thr protein kinase	20
YBR127c	VMA2	H ⁺ -ATPase V1 domain 60 KD subunit, vacuolar	19
YBR131w	Ccz1	Calcium Caffeine Zinc sensitivity	17
YDL185w	TFP1	encodes 3 region protein which is self-spliced into TFP1p and PI-SceI	19
YDR323c	PEP7	vacuolar segregation protein	16
YEL027w	CUP5	H ⁺ -ATPase V0 domain 17 KD subunit, vacuolar	18
YEL051w	VMA8	H ⁺ -ATPsynthase V1 domain 32 KD subunit, vacuolar	18
YER110c	KAP123	RAN-binding protein	16
YGL095c	VPS45	vacuolar protein sorting-associated protein	16
YKL080w	VMA5	H ⁺ -ATPase V1 domain 42 KD subunit, vacuolar	16
YKL212w	SAC1	recessive suppressor of secretory defect	16
YLR240w	VPS34	phosphatidylinositol 3-kinase	19
YLR447c	VMA6	H ⁺ -ATPase V0 domain 36 KD subunit, vacuolar	22
YMR231w	PEP5	vacuolar biogenesis protein	18
YNL183c	NPR1	ser/thr protein kinase	17
YNL268w	LYP1	Lysine permease	16

ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Hemmhof-Durchmesser [mm]
YOR270c	VPH1	H ⁺ -ATPase V0 domain 95K subunit, vacuolar	16
YPL234c	TFP3	H ⁺ -ATPase V0 domain 17 KD subunit, vacuolar	21
YPR036w	VMA13	H ⁺ -ATPase V1 domain 54 KD subunit, vacuolar	20

Auffallend bei der Auswertung des Mutantenscreenings war die Tatsache, dass die Mutanten, die einen Phänotyp zeigten, in ähnliche funktionelle Kategorie eingeordnet werden konnten bzw. an spezifischen zellulären Prozessen beteiligt sind. Diese werden im Weiteren näher besprochen.

3.1.4.1 Phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit Defekten in der frühen Endozytose

Bei einem Großteil der Hefemutanten, die sich gegen K28-Toxin resistent oder vermindert sensitiv verhielten, handelt es sich bei den deletierten Genprodukten um Proteine, die an der frühen Endozytose beteiligt sind.

In Tabelle 13 sind diese zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 13: Deletierte Genprodukte mit Funktionen in der frühen Endozytose und K28-Phänotyp

Der Hemmhofdurchmesser des Wildtyps BY4742 betrug auf Minimal-Glukose-Methylenblauagar 13 mm.

Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Hemmhof-Durchmesser [mm]
<i>DID4</i>	class E vacuolar-protein sorting and endocytosis factor	9
<i>EDE1</i>	EH domain protein involved in endocytosis	7
<i>END3</i>	required for endocytosis and cytoskeletal organization	0
<i>END4</i>	cytoskeleton assembly control protein	0
<i>MYO5</i>	myosin I	9
<i>PKH1</i>	ser/thr protein kinases	9
<i>RVS167</i>	reduced viability upon starvation protein	10
<i>SAC6</i>	actin filament bundling protein, fimbrin	0
<i>SHE4</i>	required for mother cell-specific gene expression	0
<i>SLA1</i>	cytoskeleton assembly control protein	0
<i>VPS74</i>	similarity to hypothetical <i>S.pombe</i> protein	0
<i>VRP1/END5</i>	verprolin	0
<i>YPK1</i>	ser/thr-specific protein kinase	5

3.1.4.2 Einfluss von Clathrin auf den Wirkungsmechanismus von K28

Clathrin ist in der Hefe für die Bildung von „Clathrin-coated vesicles“ an der Plasmamembran sowie am TGN verantwortlich (Kirchhausen, 2000). Im Hefegenom sind zwei Gene vorhanden, die für die Clathrin leichte Kette (*CLC1*) und schwere Kette (*CHC1*) kodieren. Clathrin-Mutanten besitzen Defekte bei der rezeptorvermittelten Endozytose und weisen Mislokationen von Golgi-residenten Proteinen zur Plasmamembran auf (Clare *et al.*, 1991; Payne and Schekman, 1989; Tan *et al.*, 1993). Gendelektionen der schweren und der leichten Kette von Clathrin zeigten unterschiedliche Phänotypen gegen K28-Toxinkonzentrat. Die $\Delta clc1$ Mutante zeigte mit einem Hemmhof von 12 mm im Vergleich zum Wildtypstamm BY4742 mit 13 mm keinen signifikanten Unterschied in der Toxinsensitivität. Die $\Delta chc1$ Mutante verhielt sich dagegen Toxin-resistent (siehe Abbildung 14).

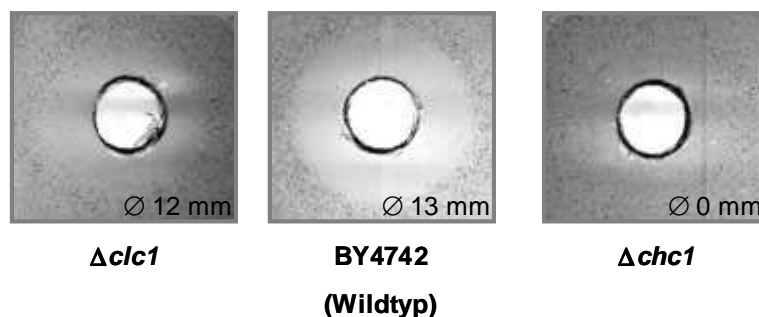


Abbildung 14: Agardiffusionstest von Hefen mit Deletionen in den Genen der leichten (*CLC1*) und schweren Kette (*CHC1*) von Clathrin und deren isogenem Wildtyp.

Die Sensitivität der Stämme wurde im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bestimmt und als Hemmhofdurchmesser [Ø] angegeben.

3.1.4.3 Einfluss des AP-Komplexes auf die Toxinsensitivität

In Säugerzellen ist Clathrin bei der Bildung von Vesikeln auf die Funktion eines heteromeren Komplexes aus vier Proteinen, dem sogenannten Adaptor-Protein-Komplex (AP) angewiesen (Schmid, 1997). Hierbei besteht jeder Komplex aus zwei großen (β und entweder α , γ , δ , oder ϵ), einer mittleren (μ) und einer kleinen Untereinheit (σ). Die vier unterschiedlichen Adaptor-Protein-Komplexe des Säugers unterscheiden sich aufgrund ihres Wirkungsortes in der Zelle voneinander. So ist z.B. der AP-1-Komplex bestehend aus den Untereinheiten γ , β_1 , μ_1 und σ_1 am TGN lokalisiert, während der AP-2-Komplex, zusammengesetzt aus den Untereinheiten α , β_2 , μ_2 und σ_2 , seine Funktion an der Plasmamembran erfüllt (Schmid, 1997). Über Sequenzhomologien konnten AP-Untereinheiten auch in der Hefe gefunden werden, wobei diese in drei potentielle AP-Komplexe eingeteilt werden.

Deletionsmutanten aller Untereinheiten der drei AP-Komplexe wurden im Minimal-MBA (pH4,7) gegen K28-Toxin getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Mutanten der Komplexe AP-1 und AP-3 zeigten im Vergleich zum Wildtypstamm BY4742 keine signifikanten Unterschiede in ihrer Toxinsensitivität. Im Unterschied hierzu zeigten alle Mutanten des AP2R-Komplexes eine komplette Resistenz gegen K28 mit Ausnahme der $\Delta ap/3$ Mutante, die mit 2 mm Hemmhofdurchmesser im MBA-Test noch eine minimale Restsensitivität zeigte. Da die Disruption der Gene des AP-2R-Komplexes in Hefe keinen Effekt im Bezug auf bislang untersuchte Zellmechanismen hat, stellt die hier beobachtete Resistenz gegen K28 den ersten Phänotyp für diese Gruppe von Genen dar.

Tabelle 14: Vergleichende Toxinsensitivitäten von Hefen mit Mutationen in einzelnen Untereinheiten der AP-Komplexe der Hefe.

Die Sensitivität der Stämme wurde im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bestimmt und als Hemmhofdurchmesser angegeben. K28-resistente Mutanten mit Defekten in AP-2R Komponenten sind im Fettdruck dargestellt.

AP-Komplex	relevanter Genotyp	Untereinheit	Hemmhof-Durchmesser [mm]
AP-1	<i>Δapl2</i>	β1	12
	<i>Δapl4</i>	γ	11
	<i>Δapm1</i>	μ1	11
	<i>Δaps1</i>	σ1	11
	<i>Δapm2</i>	?	14
AP-2R	<i>Δapl1</i>	β2R	0
	<i>Δapl3</i>	αR	2
	<i>Δapm4</i>	μ2R	0
	<i>Δaps2</i>	σ2R	0
AP-3	<i>Δapl6</i>	β3	13
	<i>Δapl5</i>	δ	13
	<i>Δapm3</i>	μ3	13
	<i>Δaps3</i>	σ3	11
BY4742	Wildtyp	-	13

3.1.4.4 Einfluss der vakuolären ATPase auf die K28-Toxizität

Die Hauptaufgabe der V-ATPase in Hefe besteht in der Azidifikation der Vakuole und in der sich daran anschließenden Aktivierung der vakuolären Hydrolasen. Sie ist aus zwei funktionellen Domänen aufgebaut. Bei diesen handelt es sich um die integrale Membrandomäne V_0 , die aus acht Untereinheiten besteht und für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist und die zytoplasmatische V_1 -Domäne, die aus fünf Untereinheiten besteht und die Protonen-Translokation vornimmt. Mutationen in den verschiedenen Untereinheiten der V-ATPase resultieren immer in deren Funktionsverlust (Forgac, 1999; Kucharczyk and Rytka, 2001; Preston *et al.*, 1989).

Hefen mit Deletionen in den Genen dieser Untereinheiten wurden gegen K28-Toxin im Minimal-MBA getestet, außer zwei Deletionsmutanten der Gene *TFP1* und *VMA10* aus der V_1 -Domäne, die nicht in der Mutantensammlung vorhanden waren. Von den restlichen 11 getesteten Mutanten zeigten acht einen hypersensitiven Phänotyp im Vergleich zum Wildtypstamm BY4742. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Die hypersensitiven Mutanten zeigten Hemmhofdurchmesser von 16-22 mm im Unterschied zum isogenen Wildtyp, der einen Hemmhof von 13 mm entwickelte. Hierbei zeigten Mutationen in der integralen Membrandomäne V_0 einen stärkeren Einfluss als Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne V_1 . Die Hefedeletionsmutanten $\Delta vma11/16$ und $\Delta vma6$ zeigten um das 13 bzw. 19-fache gesteigerte Sensitivitäten, bei denen es sich um die stärksten im Screen gemessenen handelte (Abbildung 15).

Tabelle 15: Vergleichende Toxinsensitivitäten von Hefen mit Mutationen in einzelnen Untereinheiten der V-ATPase

Die Sensitivität der Stämme wurde im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bestimmt und als Hemmhofdurchmesser angegeben.

V-ATPase-Domäne	relevanter Genotyp	Hemmhofdurchmesser [mm]
V ₀	<i>Δvph1</i>	16
	<i>Δstv1</i>	13
	<i>Δvma3</i>	18
	<i>Δvma11/16</i>	21
	<i>Δvma6</i>	22
	V ₁	<i>Δtfp1</i>
<i>Δvma2</i>		19
<i>Δvma5</i>		16
<i>Δvma8</i>		18
<i>Δvma4</i>		13
<i>Δvma7</i>		11
<i>Δvma10</i>		n.b.
<i>Δvma13</i>		20
BY4742	Wildtyp	13

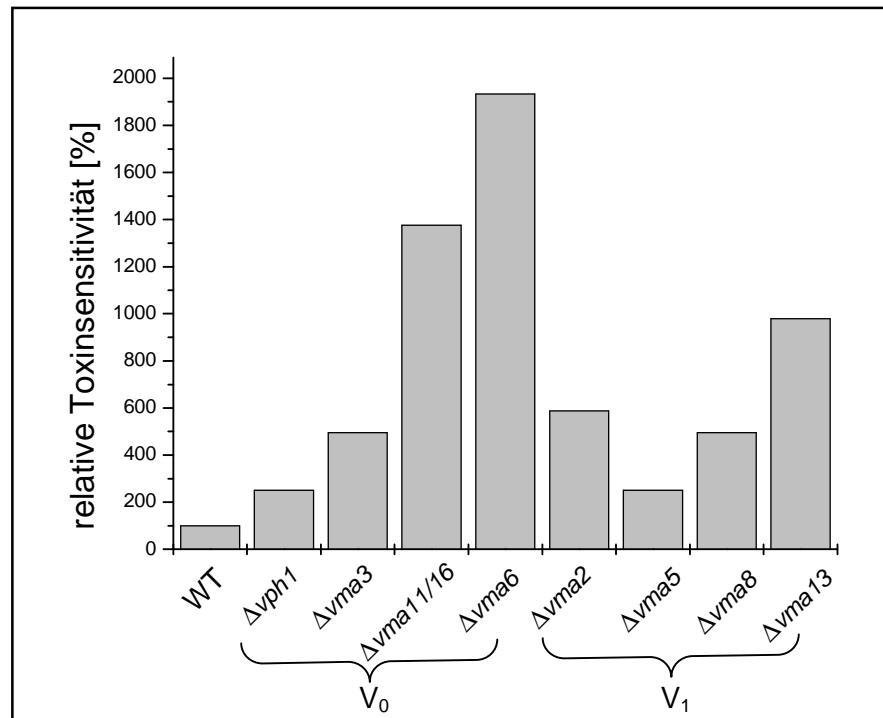


Abbildung 15: Vergleichende Toxin-Sensitivitäten von Deletionsmutanten der vakuolären ATPase.

Dargestellt sind die relativen Toxinsensitivitäten der Deletionsmutanten in den Domänen der V-ATPase V_0 und V_1 im Vergleich zum Wildtypstamm BY4742. Die Werte wurden aufgrund der ermittelten Eichgeraden bestimmt (siehe Anhang Abbildung 45). 100% relative Toxinsensitivität entsprechen einem im MBA-Test erhaltenen Hemmhof von 13 mm.

3.1.4.5 Einfluss der Mn^{2+}/Ca^{2+} -Ionen-Pumpe Pmr1p und der Ca^{2+} -Konzentration auf den K28-Wirkungsmechanismus

Die P-ATPase Pmr1p ist im medialen Golgi lokalisiert. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Ca^{2+} -Konzentration im Sekretionsweg aufrecht zu erhalten, wozu sie unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in den Golgi-Apparat pumpt. Hefemutanten mit einer Deletion des *PMR1*-Gens zeigen eine um 50% verminderte Ca^{2+} -Konzentration im ER (Strayle *et al.*, 1999).

Die Hefemutante $\Delta pmr1$ zeigte im Vergleich zu ihrem isogenen Wildtyp eine vollständige Resistenz gegen das K28-Toxin (Abbildung 16). Diese Resistenz konnte durch exogene Applikation von Ca^{2+} in Form von $CaCl_2$ wieder vollständig aufgehoben werden. Ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 40 mM entsprach die Sensitivität der $\Delta pmr1$ Mutante wieder der des Wildtyps BY4742 (Abbildung 17). Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration beim Wildtypstamm zeigte keinen Effekt (nicht dargestellt).

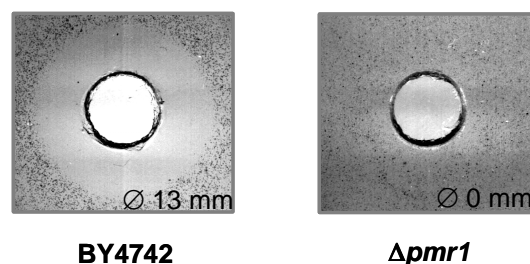


Abbildung 16: Agardiffusionstest zum Nachweis einer K28-Toxinresistenz in einer $\Delta pmr1$ Nullmutante.

Die Sensitivität von Wildtyp (BY4742) $\Delta pmr1$ Mutante wurde im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bestimmt und als Hemmhofdurchmesser angegeben [\emptyset].

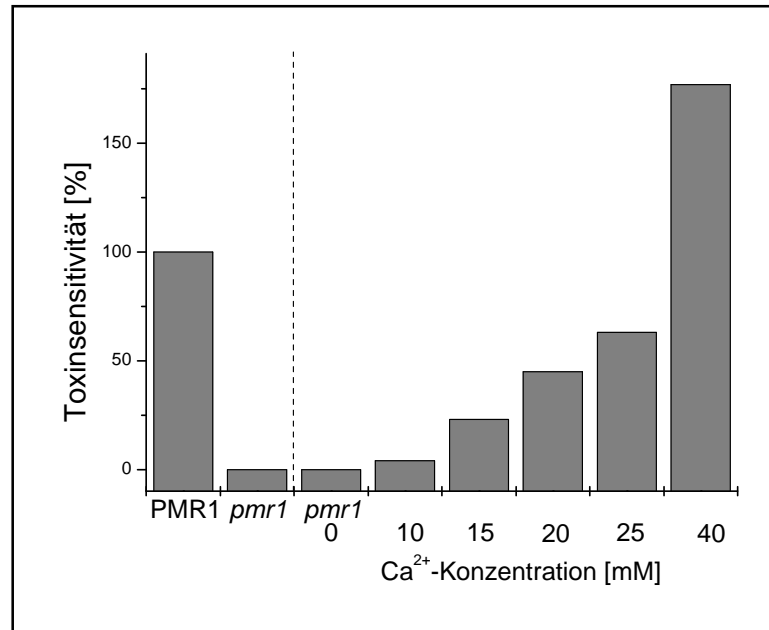


Abbildung 17: Vergleichende K28-Toxinsensitivitäten einer $\Delta pmr1$ Deletionsmutante bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.

Die Toxinsensitivität der $\Delta pmr1$ Mutante wurde im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bestimmt und mit Hilfe der Eichgerade des Wildtypstammes BY4742 errechnet (vergleiche Anhang Abbildung 45). Der Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Sensitivität des Stammes wurde durch Zugabe von $CaCl_2$ in unterschiedlichen Konzentrationen zum MBA bestimmt. 100% relative Toxinsensitivität entsprechen einem im MBA-Test erhaltenen Hemmhof von 13 mm.

3.2 Untersuchungen zur ER-Zytosol-Translokation des K28-Toxins

Eisfeld konnte zeigen, dass das K28-Toxin durch Endozytose in die Zelle eindringt und retrograd von der Zelloberfläche bis ins Zytosol transportiert wird (Eisfeld *et al.*, 2000). Der Export von K28 aus dem ER ins Zytosol erfolgt über das Sec61 Translokon. An der Retrotranslokation sind neben Sec61p auch das ER Chaperon Kar2p, möglicherweise Calnexin sowie Sec63p beteiligt. Das Toxin nutzt dabei Teile eines Mechanismus, der normalerweise fehlgefalteten Proteinen vorbehalten ist. Diese werden im ER erkannt und durch das Sec61 Translokon ins Zytosol transportiert, wo sie am Proteasom abgebaut werden. Je nach Substrat sind an diesem Prozess weitere, im ER Lumen lokalisierte Chaperone (Scj1p, Jem1p, PDI) sowie zytosolische Chaperone (CDC48-Komplex, Ssa1-4p, Ssb1p, Ssb2p) beteiligt.

Um den Transportmechanismus von K28 über die ER-Membran weiter aufzuklären, sollten Hefen untersucht werden, die durch chromosomale Mutationen im ERAD-Weg (ER associated degradation) gestört sind.

3.2.1 Untersuchungen zum Einfluss der ER-Chaperone Scj1p und Jem1p auf den Export von K28 in das Zytosol sensibler Hefen

Nishikawa und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass für den Export von einigen fehlgefalteten Proteinen aus dem ER ins Zytosol zwei verschiedene J-Domänen enthaltende ER-Proteine nötig sind. Deletionen dieser DnaJ-ähnlichen Proteine Jem1p und Scj1p führten zur Stabilisierung und Aggregation des mutierten pro- α -Faktors (Δ Gp α F) und einer mutierten Form der Carboxypeptidase Y (CPY*) im ER.

Im Agardiffusionstest zeigten die Δ scj1 Mutante SNY1025 und die Δ jem1 Mutante SNY1028 eine identische Sensitivität wie der isogene Wildtyp Stamm SEY6210. Die Doppelmutante SNY1026-7A (Δ scj1 Δ jem1) verhielt sich dagegen vollständig Toxin resistent im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 18)

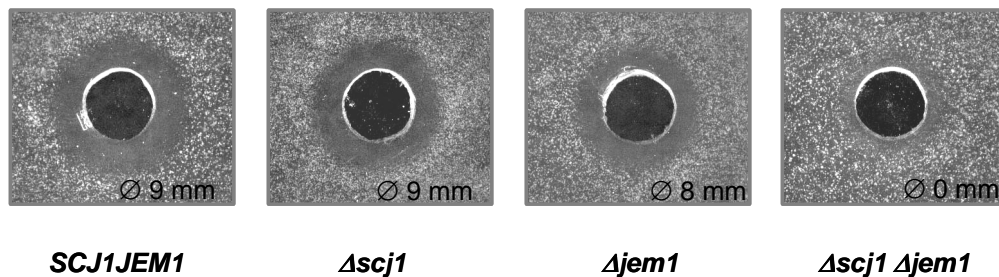


Abbildung 18: Agardiffusionstest zur Bestimmung der Toxinresistenz der $\Delta scj1 \Delta jem1$ Doppelmutante *S. cerevisiae* SNY1026-7A und der K28-Sensitivität der Stämme *S. cerevisiae* SNY1025 ($\Delta scj1$) und SNY1028 ($\Delta jem1$)

Die Hefen wurden jeweils für drei Tage bei 20°C auf MBA-Platten (pH 4,7) inkubiert und gegen K28-Toxinkonzentrat getestet. Als Kontrolle wurde der Wildtyp Stamm SEY6210 mitgeführt. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] ist angegeben.

3.2.2 Subzelluläre Lokalisation von K28-Toxin in einer $\Delta scj1 \Delta jem1$ Doppelmutante

Mit Hilfe von Zellfraktionierungsexperimenten sollte im folgenden untersucht werden, ob das Fehlen der beiden Proteine Scj1p und Jem1p die Effizienz der Translokation des K28-Toxins ins Zytosol beeinflusst. Hierzu wurden die Stämme *S. cerevisiae* SNY1026-7A und *S. cerevisiae* SEY6210 wie unter Punkt 2.24 behandelt und mit Toxinkonzentrat inkubiert. Nach dem Zellaufschluss mittels Homogenisator und subzellulärer Fraktionierung wurden die unterschiedlichen Membran-Fraktionen erhalten (P1, P2, P3). Diese wurden zusammen mit den gefällten Proteinen der zytosolischen Fraktion in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einem anti- β -Antikörper zum Toxin-Nachweis behandelt. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, wurde das K28-Toxin in der $\Delta scj1 \Delta jem1$ Mutante zwar von den Zellen aufgenommen, was durch ein Signal in der Vesikelfraktion bestätigt wird, aber nicht bis ins Zytosol transportiert. Dieses Ergebnis bestätigt den beobachteten Phänotyp der Mutante im Agardiffusionstest, die sich im Unterschied zum isogenen Wildtyp resistent gegen K28-Toxin verhielt.

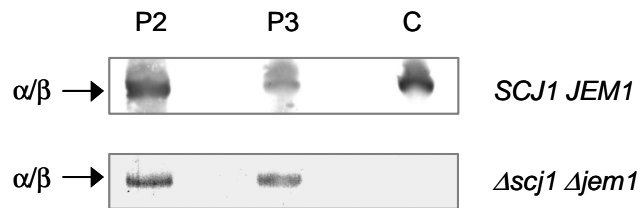


Abbildung 19: Western Blot zum Nachweis von K28-Toxin in subzellulären Fraktionen von *S. cerevisiae* SEY6210 (Wildtyp) und SNY1026-7A ($\Delta scj1 \Delta jem1$) nach Inkubation mit Toxinkonzentrat bei 20°C.

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen anti- β -Antikörper.

P2: ER-Membranen, Plasmamembranen, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Endosomen, Vesikel, Golgi Membranen

C: zytosolische Fraktion

3.2.3 Einfluss der Protein-Disulfid-Isomerase auf den ER-Zytoplast-Transport des K28-Toxins

Wie bereits deutlich gemacht wurde sind die ER-Chaperone Kar2p, Cne1p, Scj1p und Jem1p sowie das Sec61 Translokon am ER-Zytoplast-Transport von K28 beteiligt (Eisfeld *et al.*, 2000; diese Arbeit). Gillece und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass Kar2p mit der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) im ER interagiert und dass in einer *pdi1* Mutante der mutierte pro- α -Faktor ($\Delta GpaF$) und die mutierte Form der Carboxypeptidase Y (CPY*) im ER stabilisiert vorliegen. Um zu untersuchen, ob PDI auch für den Export des K28-Toxins aus dem ER ins Zytosol essentiell ist, wurde eine $\Delta pdi1$ Mutante und deren isogener Wildtyp im MBA-Test untersucht.

Da die gleichzeitige Deletion des *PDI1* Gens und seiner Homologen *MPD1*, *MPD2*, *PCR1* und *ENG1* letal wäre, wurde eine Mutante (M4492) benutzt, deren Lebensfähigkeit durch die Expression von *MPD1* auf einem 2 μ -Plasmid gewährleistet wird (Norgaard *et al.*, 2001). Im Agardiffusionstest zeigte diese Mutante im Unterschied zum Wildtyp eine deutliche Resistenz gegen exogen appliziertes K28-Toxin (Abbildung 20). Die plasmidgetriebene

Überexpression des *PDI1* Gens verlieh der Δpdi Mutante wieder eine deutliche Toxin-Sensitivität. Dies wurde nachgewiesen, indem der Stamm M4492 mit dem episomalen Vektor pCT38 transformiert wurde, der das *PDI1* Gen konstitutiv zur Expression bringt .

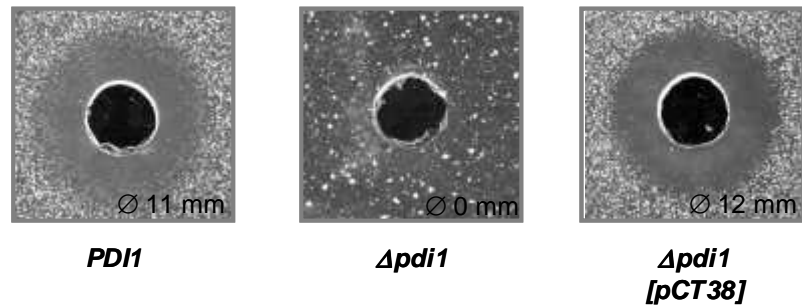


Abbildung 20: Agardiffusionstest zur Bestimmung von Toxin-Resistenz bzw. – Sensitivität der $\Delta pdi1$ Mutanten M4492 vor und nach Transformation mit dem PDI-tragenden Hefeexpressionsvektor pCT38.

Wildtyp (Stamm W303) und $\Delta pdi1$ Mutante wurden jeweils drei Tage bei 20°C auf MBA-Platten (pH 4,7) inkubiert und gegen K28-Toxinkonzentrat getestet. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] ist angegeben

3.2.4 Subzelluläre Fraktionierung zur Untersuchung des Einflusses von PDI auf die ER-Zytosol-Translokation

Um genauer aufzuklären, welchen Einfluss die PDI auf die Translokation des K28-Toxins ins Zytosol hat, wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die Stämme *S. cerevisiae* M4492 und M4492[pCT38] bis zu einer Zellzahl von 10^7 Zellen/ml kultiviert, wie unter Punkt 2.24 beschrieben sphäroplastiert und mit Toxinkonzentrat behandelt. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die differentielle Zentrifugation, wobei die erhaltenen subzellulären Fraktionen unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen Tris/Tricingel aufgetrennt wurden. Nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran wurde das K28-Toxin durch einen gegen die β -Untereinheit gerichteten polyklonalen Antikörper detektiert (Tabelle 7). Die Western-Analyse ergab, dass das Toxin in dem, mit dem *PDI1* tragenden Vektor pCT38 rücktransformierten Stamm M4492 in allen Fraktionen nachweisbar war, während bei der $\Delta pdi1$ Mutante M4492 kein Toxin im Zytosol detektierbar war (Abbildung 21). Es kann somit gefolgert werden, dass das Toxin in einer $\Delta pdi1$ Mutante endozytotisch aufgenommen wird, aber nicht mehr in der Lage ist, das Zytosol zu erreichen und somit seine Toxizität verliert.

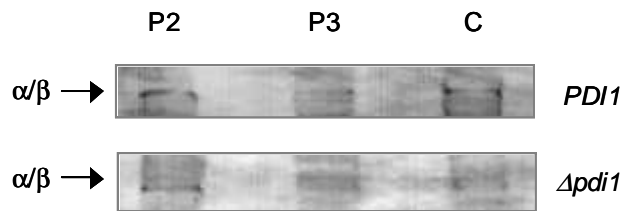


Abbildung 21: Western-Analyse subzellulärer Fraktionen toxinbehandelter Zellen der $\Delta pdi1$ Mutante M4492 vor und nach Transformation mit dem *PDI1* tragenden Plasmid pCT38.

Die jeweiligen Fraktionen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen anti- β -Antikörper.

P2: ER-Membranen, Plasmamembranen, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Endosomen, Vesikel, Golgi Membranen

C: zytosolische Fraktion

3.2.5 Untersuchungen der Oxidase-Mutanten *Ero1p* auf Toxinsensitivität

Für Cholera Toxin ist bekannt, dass die PDI als ein Redox-abhängiges Chaperon wirkt und dabei abhängig von der Oxidase *Ero1p* ist. PDI bindet und entfaltet in ihrem reduzierten Zustand das Toxin und entlässt es bei der Oxidation durch die membranständige Oxidase *Ero1p* in das Sec61 Translokon (Tsai and Rapoport, 2002). Um zu untersuchen, ob PDI ebenso benötigt wird, um K28 mit Hilfe von *Ero1p* zu entfalten, wurde eine temperatursensitive *ero1* Mutante getestet.

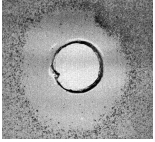
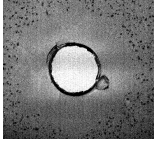
Die Hefemutante *S. cerevisiae* M4560 sowie der isogene Wildtyp *S. cerevisiae* W303 wurden im Agardiffusionstest auf Resistenz/Sensitivität gegen exogen appliziertes K28-Toxinkonzentrat untersucht. Der Lochplattentest wurde sowohl bei der permissiven Temperatur (20°C), als auch bei der restriktiven Temperatur von 35°C durch geführt.

Im Agardiffusionstest gegen K28 verhielt sich die *ero1* Mutante, wie auch der zugehörige Wildtyp sowohl bei permissiver, als auch bei restriktiver Temperatur sensitiv. Wildtyp und Mutante zeigten bei einer Temperatur von 34°C einen klaren Hemmhofdurchmesser von 13 mm (Tabelle 16). Die

Toxinstabilität nahm mit steigender Temperatur nicht ab, wie im Agardiffusionstest anhand des *Ero1*⁺-Wildtyps sowie des hypersensitiven *S. cerevisiae* Stammes 192.2d nach Toxinbehandlung bei 20°C, 30°C und 35°C gezeigt werden konnte (nicht dargestellt).

Tabelle 16: K28-Toxinsensitivität einer temperatursensitiven *ero1* Mutante im Vergleich zum isogenen Wildtyp

Die Sensitivität der angegebenen Stämme wurde im Agardiffusionstest (Minimal-MBA, pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bei der restriktiven Temperatur von 35°C bestimmt.

<i>S. cerevisiae</i>	Hemmhofdurchmesser [mm]	Phänotyp (Minimal-MBA)
W303 (WT)	13	
M4560 (<i>ero1-ts</i>)	13	

3.2.6 Einfluss der PDI-Isomerase-Aktivität auf die K28-Wirkung

Als Mitglied der Thioredoxin-Familie enthält Pdi1p zwei katalytisch aktive Zentren, die aus den Aminosäuremotiven Cys-Gly-His-Cys (CGHC) bestehen. Damit ist das Enzym in der Lage zwei verschiedene Disulfid-Reaktionen zu katalysieren. Zum einen eine oxidative Reaktion, bei der die intramolekularen Disulfide des CGHC-Motivs auf zwei im Substrat ansässige Sulfhydrylgruppen im Substratprotein übertragen werden, zum anderen eine Isomerase-Reaktion, bei der die Disulfide des Substrates umgebaut werden, indem gemischte Disulfide zwischen dem ersten Cystein-Rest des CGHC Motivs und dem Substrat entstehen (Holst *et al.*, 1997; Solovyov *et al.*, 2004).

In beiden CGHC-Domänen ist nur der jeweils erste Cystein-Rest für die Isomerase-Aktivität von Pdi1p verantwortlich. Um den Einfluss der Isomerase-Aktivität auf den Wirkungsmechanismus des K28-Toxins zu untersuchen, wurden zwei *pdi1* Mutanten (CGHS-SGHS-[PDI] und SGHS-CGHS-[PDI]) untersucht, die einen Defekt in der Protein-Oxidation aufweisen, aber eine funktionelle Isomerase-Aktivität besitzen (Holst *et al.*, 1997).

Hierzu wurde die $\Delta pdi1$ Mutante M4130, die *PDI1* auf einem episomalen Vektor mit *URA3* Marker unter der Kontrolle eines *GAL*-Promotors trägt, mit *TRP*-Plasmiden (Q3020, Q3025) transformiert, die die zwei Pdi1p Varianten trugen. Die Hefezellen wurden dann gezwungen, das *URA*-Plasmid mit dem Wildtyp *PDI1* Gen zu verlieren, indem sie auf 5'-FOA haltigen Agarplatten ausplattiert wurden. In Anwesenheit des *URA3*-Gens verarbeiten Hefezellen 5'-FOA zu Fluorodesoxyuridin, welches für die Zellen toxisch ist. Hefezellen, die eine Mutation im *URA3*-Gen tragen, können deshalb in Gegenwart von 5'-FOA wachsen, solange Uracil im Medium vorhanden ist. Ein 5'-FOA-Medium ist deshalb geeignet um Zellen zu selektieren, die keine *URA*-Plasmide mehr tragen. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, zeigten beide $\Delta pdi1$ Mutanten mit Mutationen im aktiven Zentrum im MBA-Test gegen K28 wieder eine vollständige Sensitivität. Daraus kann gefolgert werden, dass die

Isomerase-Aktivität von Pdi1p einen Einfluss auf die ER-Zytosol-Translokation des K28-Toxins hat.

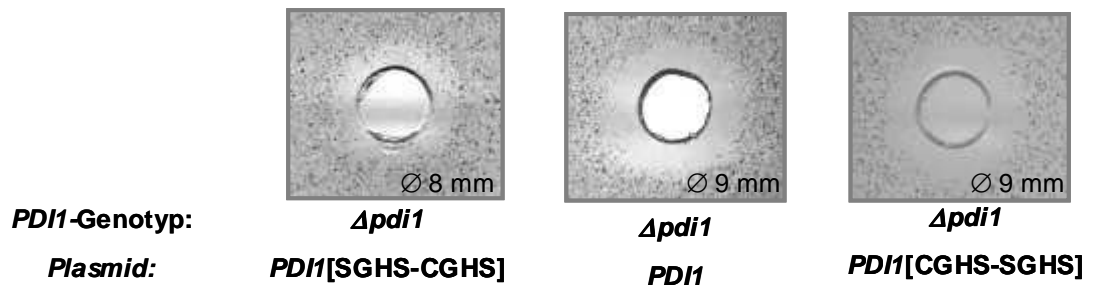


Abbildung 22: Agardiffusionstest zur Bestimmung der Toxinsensitivität der $\Delta pdi1$ Mutante M4130 nach Galaktose induzierter Expression von Wildtyp-Pdi1p bzw. von Pdi1p-Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum.

Die betreffenden Hefen wurden jeweils drei Tage bei 20°C auf MBA-Platten (pH 4,7) inkubiert und gegen K28-Toxinkonzentrat getestet. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] ist angegeben.

3.2.7 Einfluß zytosolischer Chaperone auf die Toxin-Retrotranslokation

3.2.7.1 Phänotypische Charakterisierung von Hefemutanten mit Defekten im CDC48-Komplex

Die zytosolische AAA-ATPase Cdc48p ist an der Dislokation von ERAD-Substraten aus dem ER ins Zytosol beteiligt. In einer *cdc48* Mutante konnte eine Akkumulation von ERAD-Substraten im ER nachgewiesen werden (Rabinovich *et al.*, 2002). Daraus wurde geschlossen, dass Cdc48p auf der zytosolischen Seite des ER, zusammen mit seinen Co-Faktoren Ufd1p und Npl4p, unter ATP-Verbrauch fehlgefaltete Proteine über die ER-Membran transportiert und dem Proteasom zum Abbau zuführt (Lord *et al.*, 2002).

Um den Einfluss des CDC48-Komplexes auf die Translokation des K28-Toxins zu testen, wurden Hefemutanten der entsprechenden Gene auf Toxinsensitivität getestet. Wie in Tabelle 17 zu sehen ist, zeigte die temperatursensitiven Mutanten mit Defekten in *CDC48* (*cdc48-3*, Stamm WPY106), bzw. in *NPL4* (*npl4-1*, *npl4-2*, Stamm PSY2340 und PSY2341) bei

23 bzw. 25°C im Vergleich zu den isogenen Wildtypen (W303, S288C) keine Abweichungen in der Toxinsensitivität. Die *ufd1-1* Mutante (Stamm PM373) zeigte mit einem Hemmhofdurchmesser von 18 mm gleiche Toxinsensitivität wie der Wildtypstamm (BWG1-7a).

Tabelle 17: Vergleichende Toxinsensitivitäten von Hefemutanten mit Defekten im Cdc48p/Npl4p/Ufd1p-Komplex.

Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA, pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat getestet.

<i>S. cerevisiae</i> Stamm	relevanter Genotyp	Hemmhof-Durchmesser [mm]
W303	<i>CDC48</i> bei 23°C	16
WPY106	<i>cdc48-3</i> bei 23°C	17
S288C	<i>NPL4</i> bei 25°C	13
PSY2340	<i>npl4-1</i> bei 25°C	13
PSY2341	<i>npl4-2</i> bei 25°C	14
BWG1-7a	<i>UFD1</i>	18
PM373	<i>ufd1-1</i>	18

3.2.7.2 Phänotypische Charakterisierung von Hefemutanten mit Defekten in zytoplasmatischen Hsp70 Chaperonen

Um zu testen, ob zytoplasmatische Chaperone der Hsp70-Familie am Toxinexport aus dem ER beteiligt sind, wurden *ssa* und *ssb* Hefemutanten im Agardiffusionstest gegen K28-Toxin untersucht. Sowohl eine Δ *ssb1* Δ *ssb2* Deletionsmutante (Stamm JN212), als auch eine temperatursensitive *ssa1-45* Δ *ssa* *ssa3* Δ *ssa4* Mutante (Stamm JB67) zeigten sowohl bei permissiver (22°C), als auch bei restriktiver Temperatur (35°C) gleiche Toxinsensitivität wie ihr isogener Wildtyp (Stamm JN55) (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Vergleichende Toxinsensitivitäten verschiedener Mutanten der Ssa- und Ssb-Chaperone Familie

Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA, pH 4,7) bei angegebener Temperatur gegen K28-Toxinkonzentrat getestet.

<i>S. cerevisiae</i> Stamm	relevanter Genotyp	Hemmhof-Durchmesser [mm]
JN55	<i>SSA SSB bei 35°C</i>	12
JN212	<i>Δssb1, Δssb2 bei 35°C</i>	12
	<i>ssa1-</i>	
JB67	<i>45 Δssa ssa3Δ Δssa4 bei 35°C</i>	12

3.3 Untersuchungen zur K28-Ubiquitinierung und zum Einfluss der Ubiquitinierung auf den Toxintransport

Bei Untersuchungen von Eisfeld (2001) stellte sich heraus, dass die Ubiquitinierung bei der Wirkung des K28-Toxins eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss der Ubiquitinierung bei der ER-Zytosol-Translokation des Toxins untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die K28 β -Untereinheit in toxinbehandelten Hefezellen ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird, während die α -Toxinuntereinheit keine Markierung durch Ubiquitin erfährt. Beim Test auf diesbezüglich relevante Ubiquitin-konjugierende Enzyme stellte sich lediglich ein Einfluss auf die Toxinwirkung durch das E2-Enzym Ubc4p heraus. Eine *ubc4* Mutante zeigte eine deutlich eingeschränkte Sensitivität gegen K28-Toxin. Mutanten, in denen zusätzlich zu *UBC4* auch noch *UBC6* oder *UBC7* deletiert vorlagen, zeigten sich sogar resistent gegen exogen appliziertes K28-Toxin. Ubc4p ist zusammen mit Ubc5p verantwortlich für den proteasomalen, Ubiquitin-abhängigen Abbau der meisten kurzlebigen und aberranten Proteine (Sommer and Seufert, 1992). Eine weitere wichtige Funktion übt Ubc4p aber auch im Zusammenwirken mit der Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p aus, wobei sie für die Ubiquitinierung von Plasmamembran-Proteinen verantwortlich sind (Hatakeyama *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktion Ubc4p in einer sensitiven Zelle auf den Wirkungsmechanismus des K28-Toxins hat.

3.3.1 Subzelluläre Lokalisation von K28 in einer Toxin-behandelten $\Delta ubc4$ Mutante

Es wurde vermutet, dass die deutlich verminderte Sensitivität von Hefen mit Deletion von *Ubc4* darauf zurückzuführen ist, dass die Ubiquitinierung der β -Untereinheit mit dem Toxin-Export aus dem ER gekoppelt sein muss. Dies würde in toxinbehandelten Zellen mit Deletion in *UBC4* zu einer Akkumulation von K28-Toxin im ER führen. Andererseits wäre es möglich, dass Ubc4p für die Ubiquitinierung des Membranrezeptors verantwortlich ist

und damit das Signal für die endozytotische Toxinaufnahme auslöst. Ein Fehlen von Ubc4p würde in diesem Falle eine Akkumulation von K28 an der Plasmamembran bewirken.

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen Ubc4p auf die Toxinwirkung hat, wurden die Stämme *S. cerevisiae* YW013 (*ubc4*) und YW01 (*UBC4*) wie unter Punkt 2.24 behandelt und mit Toxinkonzentrat inkubiert. Nach Zellaufschluss mittels Homogenisator und subzellulärer Fraktionierung wurden unterschiedliche Membran-Fractionen erhalten (P1, P2, P3), die zusammen mit den gefällten Proteinen der zytosolischen Fraktion in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem anti- β -Antikörper zum Toxin-Nachweis behandelt. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, wurde das K28-Toxin von den Zellen einer *ubc4* Mutante nicht aufgenommen, was durch ein Fehlen des Signals in der Vesikelfraktion (P3) deutlich wird. Vielmehr scheint das Toxin auf Ebene der Plasmamembran zu akkumulieren. Im Unterschied zur Mutante wurde das Toxin in Wildtyphefen effektiv aufgenommen und bis auf die Ebene des Zytosols transportiert.

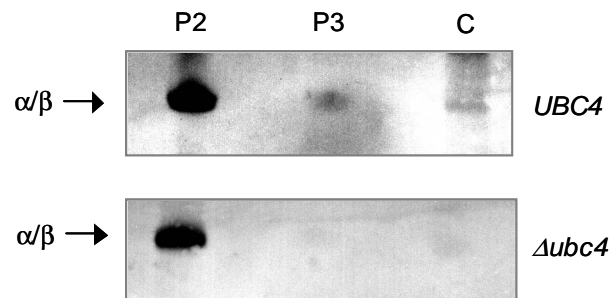


Abbildung 23: Western Blot zum Nachweis von K28-Toxin in subzellulären Fraktionen von *S. cerevisiae* YW01 (Wildtyp) und YW013 ($\Delta ubc4$) nach Inkubation mit Toxinkonzentrat bei 20°C.

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und zum Toxinnachweis mit einem polyklonalen anti- β -Antikörper.

P2: ER-Membranen, Plasmamembranen, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Endosomen, Vesikel, Golgi Membranen

C: zytosolische Fraktion

3.3.2 Vergleichende Studien zur Toxin-Aufnahme in einer $\Delta ubc4$ Deletionsmutante

Um abzusichern, dass eine *ubc4* Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht mehr in der Lage ist, Toxin endozytotisch aufzunehmen, wurden Toxinaufnahmestudien an den Stämmen YW01 (*UBC4*) und YW013 ($\Delta ubc4$) durchgeführt. Hierzu wurden die Hefen, wie unter Punkt 2.12 beschrieben, behandelt und mit Toxinkonzentrat über verschiedene Zeiträume bei 20°C auf dem Rundschüttler inkubiert. Die von den Hefen aufgenommene Toxinmenge wurde indirekt bestimmt, indem im Western-Blot die verbliebene Toxinmenge im zellfreien Überstand nachgewiesen wurde. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ist, nahm die Toxinkonzentration im Überstand der Wildtyphefe mit der Zeit kontinuierlich ab, was auf eine Aufnahme des Toxins in die Hefezellen zurückgeführt werden kann. Bei der $\Delta ubc4$ Mutante hingegen konnte keine Abnahme der Toxinmenge in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt werden, hier blieben die Toxinmengen in den zellfreien Überständen nahezu konstant.

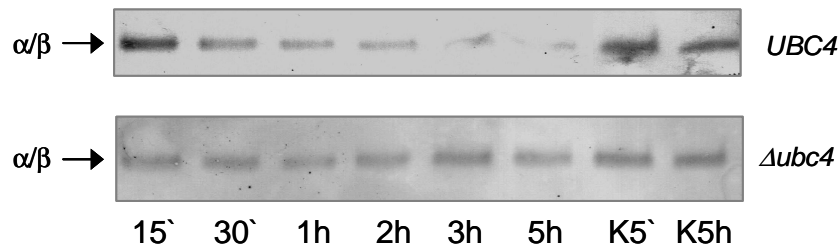


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse zur Quantifizierung der aufgenommenen Toxinmenge durch Hefen mit und ohne Deletion in *UBC4*.

Hefezellen der Stämme YW01 (*UBC4*) und YW013 ($\Delta ubc4$), wurden wie unter Punkt 2.12 beschrieben behandelt und über einen Zeitraum von 5h bei 20°C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Zur Bestimmung der Menge an nicht aufgenommenen Toxin wurden zu den angegebenen Zeiten 20 μ l der zellfreien Überstände entnommen, mit 20 μ l SDS-Probenpuffer versetzt und zum Western-Blot mit anti- β Antikörper eingesetzt. Als Kontrolle wurden zellfreie Ansätze mitgeführt (K) und diese nach fünf Minuten und fünf Stunden auf Toxinstabilität getestet.

3.3.3 Konstruktion eines Hefektors zur konstitutiven Expression eines *Ubc4*^{GFP}-Fusionsproteins

Um *Ubc4p* in einer Hefezelle zu lokalisieren, wurde ein *Ubc4*/GFP-Fusionsprotein erstellt. Zu dessen Konstruktion wurde eine SOE-PCR durchgeführt (siehe 2.15.1). Hierbei wurde in einem ersten PCR-Schritt das *Ubc4*-Gen mit den Primern *XhoI-ubc4* und *GFP-ubc4* aus genomischer DNA des Stammes *S. cerevisiae* SEY6210 amplifiziert und das GFP-Gen mit Hilfe der Primer *ubc4-GFP* und *GFP-BamHI* aus dem Template $p\alpha GFP^H$ hergestellt. In einem zweiten Schritt wurden die zwei PCR-Produkte durch die Primer *XhoI-ubc4* und *GFP-BamHI* miteinander fusioniert. Das amplifizierte Konstrukt *Ubc4*^{GFP} wurden nach der Kontrolle im Agarosegel in den Vektor *pCR2.1-TOPO* zwischenkloniert und zur Überprüfung auf eventuelle Mutationen hin sequenziert (siehe 2.21). Amplifikate mit korrekter Sequenz wurden als *XhoI/BamHI*-Fragment in den zuvor mit *XhoI* und *BglIII* restringierten Vektor *pPGK* unter die Kontrolle des konstitutiven *PGK*-Promotors einkloniert, sodass der Expressionsvektor *pSL-Ubc4*^{GFP} entstand (Abbildung 25).

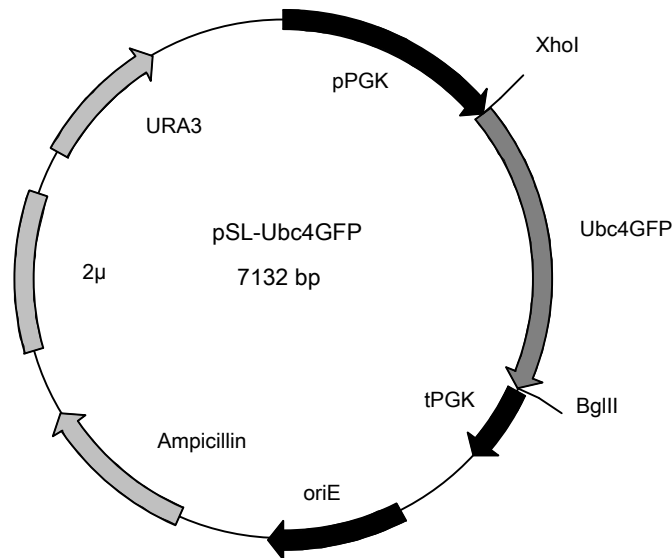


Abbildung 25: Schematischer Aufbau der Hefeexpressionsvektoren pSL-Ubc4GFP

In den Grundvektor pPGK wurde das Fusionsgen *UBC4/GFP* als *XhoI/BamHI*-Fragment einkloniert und unter die Kontrolle des hefeeigenen, konstitutiven *PGK*-Promotors geracht.

3.3.4 Nachweis der Funktionalität des Ubc4^{GFP}-Fusionsproteins durch Komplementation einer $\Delta ubc4$ Deletionsmutante

Um die Funktionalität des Ubc4GFP-Fusionsproteins zu untersuchen, wurde die $\Delta ubc4$ Mutante YW013 mit dem Vektor pSL-Ubc4^{GFP} transformiert und im MBA-Test gegen K28-Toxin getestet. Bei einer Funktionalität des Fusionsproteins sollte die Sensitivität der Deletionsmutante gegen K28-Toxin wieder hergestellt sein. Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, zeigte die $\Delta ubc4$ Mutante nach Transformation mit pSL-Ubc4^{GFP} wieder eine ausgeprägte Toxinsensitivität, wodurch die Funktionalität des Fusionsproteins bewiesen wurde.

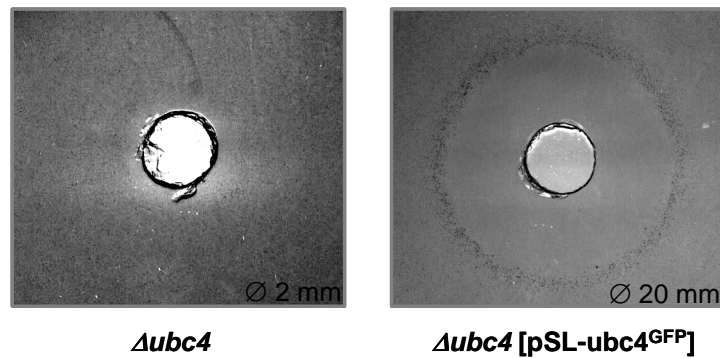


Abbildung 26: Agardiffusionstest zur Bestimmung der K28-Toxinsensitivität einer vermindert sensitiven $\Delta ubc4$ Mutante (YW013) nach Transformation mit dem *Ubc4*-tragenden Hefeexpressionsvektor pSL-*Ubc4*^{GFP}

Die betreffenden Hefen wurden vor und nach der Transformation mit pSL-*Ubc4*^{GFP} bei 20°C auf MBA-Platten gegen K28-Toxinkonzentrat getestet. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] ist angegeben.

3.3.5 Intrazelluläre Lokalisation des *Ubc4*^{GFP}-Fusionsproteins

Nach der Transformation des Hefeexpressionsvektors pSL-*Ubc4*^{GFP} in die Deletionsmutante YW013 ($\Delta ubc4$) wurde die *in vivo* Expression des Fusionsproteins durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Als Kontrolle wurde der Grundvektor pPGK-M28I mitgeführt. Zellen, die mit dem Kontrollvektor transformiert waren, zeigten keine Fluoreszenz (nicht dargestellt). Zellen, die das Fusionsprotein exprimierten, zeigten dagegen eine über die gesamte Zelle verteilte Fluoreszenz (siehe Abbildung 27).

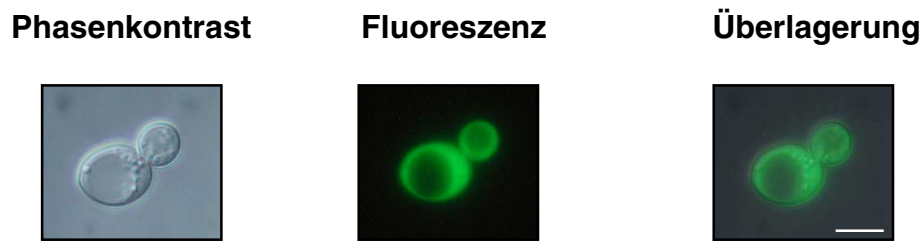


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des biologisch aktiven Fusionsproteins Ubc4p^{GFP} in einer $\Delta ubc4$ Mutante

Die $\Delta ubc4$ Mutante (YW013) wurde mit dem Vektor pSL-UBC4^{GFP} transformiert und bei 30°C in Flüssigmedium über Nacht kultiviert. Gezeigt ist eine NOMARSKI-Aufnahme, die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme und eine Überlagerung beider Bilder. Der Balken entspricht 4 μ m.

Um zu bestätigen, dass das Fusionsprotein über die ganze Zelle verteilt vorliegt, wurde die transformierte Mutante YW013[pSL-Ubc4^{GFP}] einem Zellaufschluss mit anschließender, differentieller Zentrifugation unterzogen (siehe 2.24). Die erhaltenen Überstände wurden im Western-Blot auf das Vorhandensein des Fusionsproteins überprüft. Die Ergebnisse der Western-Analyse sind in Abbildung 28 dargestellt. Es zeigte sich in allen Fraktionen ein Signal, welches dem Fusionsprotein mit einer berechneten Größe von 44 kDa entspricht. Als Kontrolle wurde die mit dem Grundvektor pPGK-M28-Ittransformierte Mutante YW013 mitgeführt, in deren Fraktionen, wie erwartet, keine Signale auftraten (nicht dargestellt).

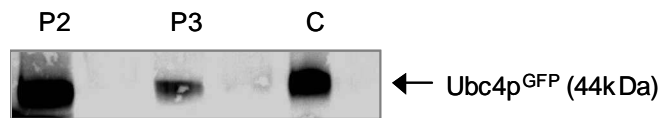


Abbildung 28: Western-Analyse zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation des biologisch aktiven Ubc4^{GFP}-Fusionsproteins in einer $\Delta ubc4$ Mutante

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper.

P2: ER-Membranen, Plasmamembranen, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Endosomen, Vesikel, Golgi Membranen

C: zytosolische Fraktion

3.3.6 Toxinsensitivität einer temperatursensitiven Hefemutante mit Defekt in der Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p

Da der Effekt des Ubiquitin konjugierenden Enzyms Ubc4p auf die Endozytose des K28-Toxins gezeigt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p ebenfalls für die Aufnahme des Toxins in eine sensitive Zelle verantwortlich sein könnte. Bei Rsp5p handelt es sich um ein essenzielles Protein der Hefe, das für die Ubiquitin-abhängige Endozytose von Plasmamembranproteinen (Hicke and Dunn, 2003) und auch für die Ubiquitinierung und den Abbau von CPY* verantwortlich ist (Haynes *et al.*, 2002).

Da eine Deletion des *RSP5*-Gens für die Hefe letal ist, wurden zwei temperatursensitive *rsp5* Mutanten mit einem Wachstumsdefekt bei 37°C (*rsp5-1* Stamm LHY23 und *rsp5-2* Stamm LHY433) sowie deren isogene Wildtypen (Stämme LHY291 und LHY 434) im Agardiffusionstest bei 20°C, 30°C und 35°C untersucht. Mit steigender Temperatur kommt es in der Mutante zu einer stark verlangsamten Aufnahme des α -Faktor-Rezeptors Ste2p. Während die isogenen Wildtypstämme eine eindeutige Sensitivität gegen das Toxin zeigten, verhielten sich die *rsp5-1* und *rsp5-2* Mutanten

vermindert sensitiv bzw. komplett resistent bei Temperaturen von 30°C und 35°C (Tabelle 19)

Tabelle 19: Vergleichende Toxinsensitivitäten in Hefen mit temperatursensitiven Mutationen im Gen der Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p

Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA, pH 4,7) bei den angegebenen Temperaturen gegen K28-Toxinkonzentrat getestet.

<i>S. cerevisiae</i> Stamm	relevanter Genotyp	Hemmhofdurchmesser [mm]		
		20°C	30°C	35°C
LHY2910	<i>RSP5</i>	6	6	5
LHY23	<i>rsp5-1</i>	3	0	0
LHY434	<i>RSP5</i>	6	4	5
LHY433	<i>rsp 5-2</i>	0	0	0

3.3.7 Subzelluläre Lokalisationsstudien zum Nachweis von K28 in einer toxinbehandelten *rsp5-1* Mutante

Mit Hilfe der Zellfraktionierungsexperimente sollte untersucht werden, ob *rsp5* Mutationen die Endozytose des K28-Toxins beeinflussen. Hierzu wurde die temperatursensitive Mutante LHY23 (*rsp5-1*) und deren isogener Wildtyp LHY2910 bei 30°C in YPD-Medium bis zu einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml kultiviert, anschließend sphäroplastiert, gewaschen und bei 35°C für zwei Stunden mit 3 ml Toxinkonzentrat inkubiert. Die Toxin-behandelten Zellen wurden dann wie unter Punkt 2.24 beschrieben subzellulär fraktioniert. Nach erfolgter Wester-Analyse der subzellulären Fraktionen der Toxin-behandelten

rsp5-1 Mutante war zu erkennen, dass das Toxin nur in der P2-Fraktion, der Membranfraktion, nachweisbar war, was im Einklang mit dem resistenten Phänotyp der Mutante gegen K28-Toxin steht. Im Unterschied dazu war im isogenen Wildtyp K28 nicht nur in der Membranfraktion (P2), sondern auch in der Vesikelfraktion (P3) und der zytosolischen Fraktion detektierbar (Abbildung 29).

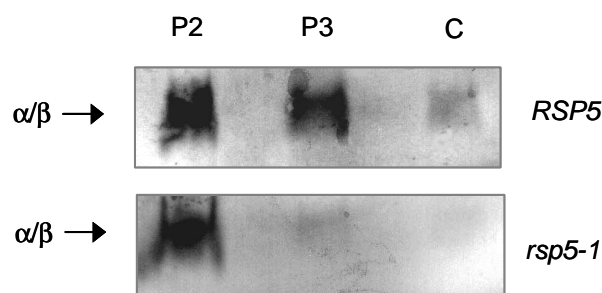


Abbildung 29: Western Blot zum Nachweis von K28-Toxin in subzellulären Fraktionen von *S. cerevisiae* LHY2910 (*RSP5*) und LHY23 (*rsp5-1*) nach Inkubation mit Toxinkonzentrat bei 30°C.

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen anti- β -Antikörper.

P2: ER-Membranen, Plasmamembranen, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Endosomen, Vesikel, Golgi Membranen

C: zytosolische Fraktion

3.3.8 Kinetik der Toxinaufnahme einer *rsp5-1* Mutante

Da die Ergebnisse der Zellfraktionierung an der *rsp5-1* Mutante auf einen Block in der Endozytose des K28-Toxins hindeuteten, sollte in Analogie zu den Untersuchungen an der $\Delta ubc4$ Mutante die Aufnahmefähigkeit in Bezug auf K28 der *rsp5-1* Mutante getestet werden. Hierzu wurden die Stämme LHY23 (*rsp5-1*) und LHY2910 (*RSP5*) wie unter Punkt 2.12 beschrieben behandelt, mit Toxinkonzentrat für fünf Stunden bei 35°C auf dem Rundschtüttler inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiten zur indirekten Bestimmung der Toxinmenge im Western-Blott eingesetzt. Wie aus Abbildung 30 deutlich wird, nahm die Toxinkonzentration im Überstand der

Wildtyphefe mit der Zeit kontinuierlich ab, was auf eine Aufnahme des Toxins in die Hefezellen schliessen lässt. Bei der *rsp5-1* Mutante hingegen konnte diese Abnahme der Toxinmenge in Abhängigkeit von der Zeit nicht festgestellt werden, da die Menge an K28 in den zellfreien Überständen nahezu konstant blieb.

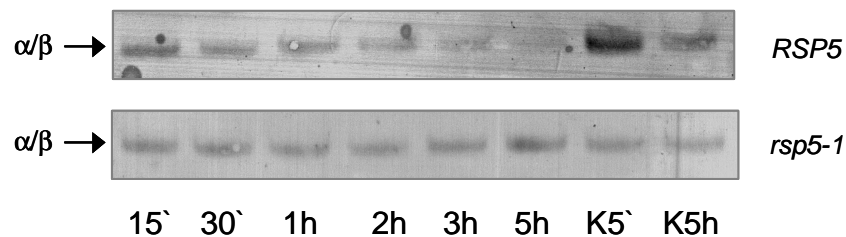


Abbildung 30: Western--Analyse zur Quantifizierung der aufgenommenen Toxinmenge durch Hefen mit und ohne temperatursensitiver Mutation im *RSP5*-Gen.

Hefezellen der Stämme LHY2910 (*RSP5*) und LHY23 (*rsp5-1*) wurden wie unter Punkt 2.12 beschrieben behandelt und über einen Zeitraum von 5 h bei 30°C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Zur Bestimmung der Menge an nicht aufgenommenem Toxin wurden 20 µl der zellfreien Überstände mit 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 10%-igem Tris/Tricin-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen die Toxin β-Untereinheit nachgewiesen. Als Kontrolle wurden zellfreie Ansätze mitgeführt (K) und diese nach fünf Minuten und fünf Stunden auf Toxinstabilität getestet.

3.3.9 Einfluss der WW-Domänen von Rsp5p auf die Toxinsensitivität

Für die Protein-Interaktion-Domänen *WW-1* und *WW-3* von Rsp5p wurde gezeigt, dass sie phosphorylierte Plasmamembranrezeptoren erkennen und auch an der Fluid-Phase-Endozytose, die anhand des Transports von Lucifer Yellow in die Vakuole gemessen wird, beteiligt sind. Hefen die *rsp5-WW-1* oder *rsp5-WW-3* Mutationen trugen, zeigten eine eingeschränkte Aufnahme des α-Faktor-Rezeptors und einen kompletten Block im Lucifer Yellow Transport zur Vakuole bei 30°C (Dunn and Hicke, 2001).

Um zu untersuchen, ob die Protein-Interaktions-Domänen von Rsp5p die Internalisation und damit die Toxizität von K28 beeinflussen, wurden *ww-1*

und *ww-3* Mutanten im Lochplattentest gegen K28 getestet. Beide Mutanten zeigten nur eine leicht reduzierte Sensitivität gegen K28-Toxin bei 30°C im Vergleich zu ihrem isogenen Wildtyp LH1654 (Tabelle 20).

Tabelle 20: Vergleichende Toxinsensitivitäten von Hefen mit Mutationen in den WW-Domänen der Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p

Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA, pH 4,7) bei 30°C gegen K28-Toxinkonzentrat getestet.

S. cerevisiae Stamm	relevanter Genotyp	Hemmhofdurchmesser [mm]
LHY1654	<i>RSP5</i>	12
LHY1729	<i>rsp5-ww1</i>	10
LHY1735	<i>rsp5-ww3</i>	8

3.3.10 Phänotypische Charakterisierung einer Deletionsmutante mit Defekt im deubiquitinierenden Enzym Doa4p

Die Ubiquitinierung von Proteinen erfolgt nicht nur als Markierung zum Abbau des solchen am Proteasom, sondern ist ebenfalls an der Regulation von Membranrezeptoren, Transportern und Kanälen in der Plasmamembran beteiligt. Diese Modifikation mit Ubiquitin dient als Signal für die Internalisierung der meisten Plasmamembranproteine und ihrem anschließendem Abbau in der Vakuole (Hicke, 1999). Da die Ubiquitinierung von Proteinen eine vielseitige und häufige kovalente Modifikation darstellt, ist eine konstante Ubiquitin-Konzentration wichtig, um eine normale Zellfunktion zu gewährleisten. Deshalb werden ubiquitinierte, lösliche Proteine und Plasmamembranproteine vor ihrem Abbau am Proteasom bzw. in der Vakuole von entsprechenden Enzymen deubiquitiniert, um den Ubiquitin-Spiegel innerhalb der Zelle auf konstantem Niveau zu halten. Eines der wichtigsten deubiquitinierenden Enzyme, das für die Freisetzung des

Ubiquitins von ubiquitinierten Plasmamembranproteinen verantwortlich ist, ist Doa4p. Mutationen im *DOA4* Gen führen zur Stabilisierung von Proteasom-Substraten, als auch zur Blockierung der Endozytose vieler Plasmamembranproteine (Dupre and Haguenauer-Tsapis, 2001).

Um den Einfluss des deubiquitinierenden Enzyms Doa4p auf den Wirkungsmechanismus von K28 zu untersuchen, wurde eine $\Delta doa4$ Mutante (Stamm MHY623) und deren isogener Wildtyp (Stamm MHY501) auf Toxinsensitivität getestet. Wie aus Abbildung 31 hervorgeht, zeigte die $\Delta doa4$ Mutante im MBA-Test eine komplette Toxinresistenz im Vergleich zum sensitiven *DOA4* Wildtyp.

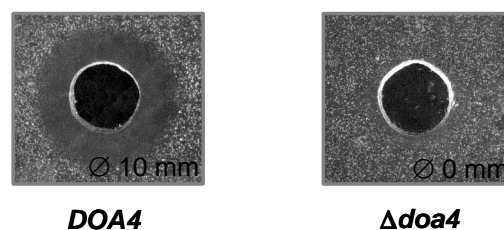


Abbildung 31: Agardiffusionstest zum Nachweis einer K28-Toxinresistenz in Hefemutanten mit einer Deletion im Gen des deubiquitinierenden Enzyms Doa4p (MHY623) und dessen isogenen Wildtyp (MHY501).

Die Sensitivität bzw. Resistenz der Stämme MHY623 ($\Delta doa4$) und MHY501 (*DOA4*) wurde im Leud/o-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bei 20°C bestimmt und als Hemmhofdurchmesser [Ø] angegeben.

3.3.11 Einfluss der Ubiquitin-Verknüpfung auf die Toxinresistenz einer $\Delta doa4$ Mutante

Das Proteasom baut vorzugsweise polyubiquitinierte Substrate ab (mit einer Kette aus mindestens vier Ubiquitin Molekülen), bei denen der Carboxy-Terminus eines Ubiquitins mit dem Lys48 des vorhergehenden Ubiquitins verknüpft ist (Hershko and Ciechanover, 1998) Die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen erfolgt hingegen über Monoubiquitin oder kurze Ubiquitin-Ketten. Diese sind, anders als der Typ von Ubiquitin-Kette der vom Proteasom erkannt wird, über Lys63 miteinander verbunden (Dupre and Haguenauer-Tsapis, 2001). Um zu überprüfen, welcher Typ von Ubiquitin-Verknüpfung am Wirkungsmechanismus des K28-Toxins eine Rolle spielt,

wurden Ubiquitin-Varianten, in denen die Lysin-Reste 48 und 63 gegen Arginin ausgetauscht wurden, in einer $\Delta doa4$ Mutanten überexpressiert. Dadurch wird die Elongation der Ubiquitin-Kette an diesen Punkten verhindert und führt dazu, dass $\Delta doa4$ Zellen diese Ubiquitin-Varianten statistisch gesehen öfter in Ubiquitin-Konjugate einbauen.

Hierzu wurde die $\Delta doa4$ Mutante (Stamm MHY623) mit den Plasmiden YEP110 und pWO21 transformiert und auf Trp d/o-Medium selektiert. Anschließend wurden die Transformanten im MBA-Test auf ihre Toxinsensitivität im Vergleich zur untransformierten Mutante untersucht. Zur Induktion der Expression der Ubiquitin-Varianten wurde 0,1 mM CuSO_4 zugesetzt. Wie in Abbildung 32 zu erkennen ist, führte die Überexpression beider Ubiquitin-Varianten zu einer wiederhergestellten Sensitivität einer $\Delta doa4$ Mutanten.

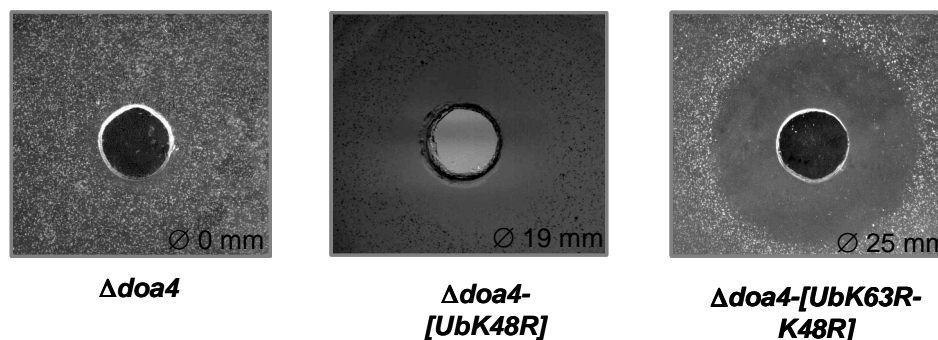


Abbildung 32: Agardiffusionstest zur Bestimmung der Toxinsensitivität einer $\Delta doa4$ Mutante (Stamm MHY623) vor und nach Transformation mit dem Ubiquitin-tragenden Hefeexpressionsvektoren YEP110 (UbK48R) und pWO21 (UbK63R-K48R)

Die betreffenden Hefen wurden jeweils drei Tage bei 20°C auf Trp d/o-MBA-Platten mit 0,1 mM CuSO_4 (pH 4,7) inkubiert und gegen K28-Toxinkonzentrat getestet. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] ist angegeben.

3.3.12 Einfluss des Proteasoms auf die Toxinwirkung

Von den sechs ATPase Untereinheiten in der 19S Kappe des Proteasoms wird angenommen, dass diese die treibende Kraft für die Retrotranslokation ubiquitiniertes Substrate vom ER in das Zytosol darstellen (Brodsky and McCracken, 1999; Mayer *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1998). Die Mutationen *pre1-1* und *pre2-2* im Proteasom führen zur Akkumulation von ubiquitinierten Konjugaten bei erhöhten Temperaturen. Um zu überprüfen, ob der Transfer des K28-Toxins ins Zytosol abhängig vom Proteasom verläuft, wurden Hefen mit diesen Mutationen gegen Toxinkonzentrat getestet. Hierzu wurden die *pre1-1* und *pre2-2* Mutanten sowie der isogene Wildtyp WCG4 im MBA-Test auf Toxinsensitivität untersucht. Dabei zeigten die untersuchten Mutanten keine Abweichungen im Vergleich zur Sensitivität des Wildtyps (Tabelle 21). Es kann deshalb angenommen werden, dass die Retrotranslokation von K28 Proteasom-unabhängig erfolgt.

Tabelle 21: Vergleichende Toxinsensitivitäten in Hefen mit Mutationen im Proteasom

Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA, pH 4,7) bei 20°C, 30°C und 35°C gegen K28-Toxinkonzentrat getestet.

<i>S. cerevisiae</i> Stamm	relevanter Genotyp	Hemmhofdurchmesser [mm]		
		20°C	30°C	35°C
WCG4	<i>PRE1, PRE2</i>	17	18	17
PRE1-1	<i>pre1-1</i>	18	18	18
Pre2-2	<i>pre2-2</i>	17	17	17

3.3.13 Konstruktion eines Hefevektors zur konstitutiven Expression einer Toxinvariante ohne Lysinrest in der β -Untereinheit

Das K28-Toxin enthält in Aminosäureposition 294 einen einzelnen Lysinrest in der β -Untereinheit. Um zu untersuchen, ob dieser Lysinrest eine Rolle bei der Toxizität von K28 spielt, wurde dieser durch PCR-Mutagenese in die Aminosäure Arginin überführt. Zur Konstruktion des K28-K294R-Gens wurde eine SOE-PCR durchgeführt (siehe 2.16.1) Hierbei wurden in einem ersten Schritt die zwei Teilstücke des K28-Gens mit den Primern E28 und K294Rrev und den Primern K294Rfor und 28H generiert, wobei das Codon AAG für Lysin gegen das Codon AGG für Arginin an Position 294 ausgetauscht wurde. Als Template für die PCR diente das Plasmid pPGK-M28I. In einem zweiten PCR-Schritt wurden die zwei PCR-Produkte durch die Primer E28 und 28H miteinander fusioniert. Das amplifizierte Konstrukt K28-K294R wurde nach der Kontrolle im Agarosegel in den Vektor pCR2.1-TOPO zwischenkloniert und zur Überprüfung eventueller Mutationen sequenziert (siehe 2.21). Amplifikate mit korrekter Sequenz wurden als *EcoRI/HindIII*-Fragment in den zuvor mit den selben Enzymen restringierten Vektor pYX242 inkloniert und unter die Kontrolle des konstitutiven *TPI*-Promotors gebracht. Der so entstandene Expressionsvektor pSL-K294R ist schematisch in Abbildung 33 dargestellt.

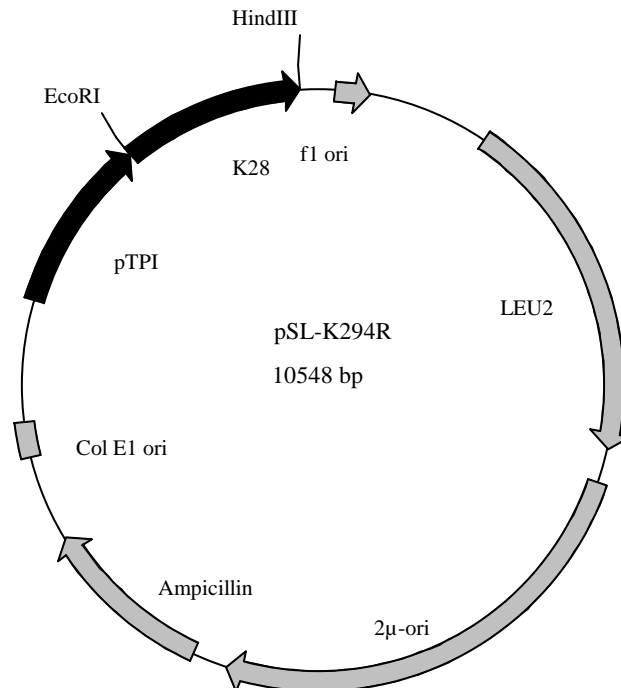


Abbildung 33: Schematischer Aufbau der Hefeexpressionsvektors pSL-K294R

In den Grundvektor pYX242 wurde das mutierte K28-Gen mit einem Austausch des Lysinrestes gegen Arginin an Position 294 als *EcoRI/HindIII*-Fragment in die MCS1 unter der Kontrolle des hefeeigenen, konstitutiven *TPI*-Promotors kloniert.

3.3.14 Konstruktion eines Hefevektors zur konstitutiven Expression von Wildtyp K28-Toxin

Da ein Vergleichskonstrukt ohne Mutationen zu dem mutierten Toxin (K294R) im gleichen Grundvektor nicht vorhanden war, wurde dieses hergestellt. Dazu wurde das Plasmid pPGK-M28I als Template eingesetzt und über eine PCR mit den Primern E28 und 28H amplifiziert.

Das Konstrukt K28 wurde nach der Kontrolle im Agarosegel in den Vektor pCR2.1-TOPO über TA-Klonierung eingefügt und zur Überprüfung auf Mutationen sequenziert (siehe 2.21). Amplifikate mit korrekter Sequenz wurden als *EcoRI/HindIII*-Fragment in den zuvor mit den selben Enzymen restringierten Vektor pYX242 in die MCS1 unter der Kontrolle des konstitutiven *TPI*-Promotors einkloniert, so dass der Expressionsvektor pSL-K28 entstand (Abbildung 34).

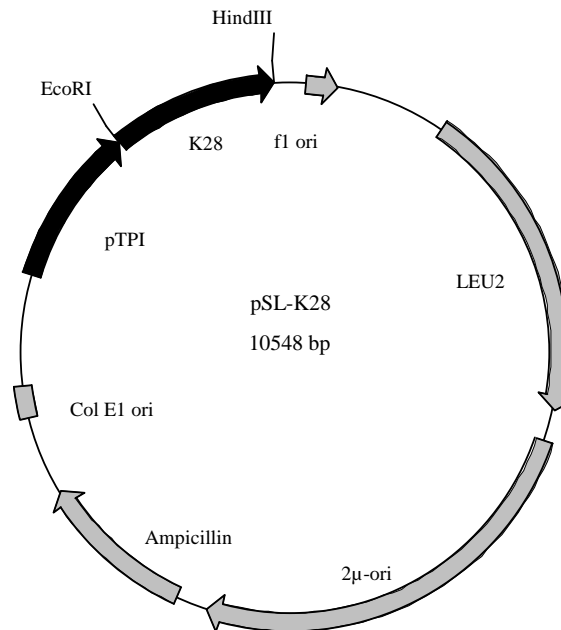


Abbildung 34: Schematischer Aufbau der Hefeexpressionsvektors pSL-K294R

In den Grundvektor pYX242 wurde das K28-Gen als *EcoRI/HindIII*-Fragment in die MCS1 unter der Kontrolle des hefeeigenen, konstitutiven *TPI*-Promotors kloniert.

3.3.15 Produktion von K28-K294R-Toxinkonzentrat

Der Vektor pSL-K294R wurde in den Stamm *S. cerevisiae* SEY6210 transformiert. Eine erhaltene Transformante wurde zur Produktion des mutierten Killertoxins wie unter Punkt 2.8 beschrieben eingesetzt und der Kulturüberstand 150-fach konzentriert.

Das Toxinkonzentrat zeigte im Agardiffusionstest eine biologische Aktivität.

3.3.16 Vergleichende Expression und Toxizität der Konstrukte K28 und K294R

Zur Bestimmung der Toxizität der mit dem Vektor pSL-K294R transformierten Hefe *S. cerevisiae* SEY6210 wurden gleiche Zellzahlen auf einen leud/o-MBA-Test mit dem eingebetteten Stamm 192.2d, transformiert mit dem Leervektor pYX242, aufgetropft und drei Tage bei 20°C bebrütet. Wie in

Abbildung 35a zu erkennen ist, zeigte das mutierte Toxin K294R gegenüber dem Wildtypotoxin gleiche Toxizität. Die anschließende Western Analyse des zellfreien (und mittels Ethanolfällung 100-fach konzentrierten) Kulturüberstandes zeigte in pSL-K294R exprimierenden Hefen eine dem Wildtyp entsprechende Menge an sekretiertem Toxin (Abbildung 35b). Als weiterer Vergleich wurde Kulturüberstand einer weiteren Toxinvariante von K28 im Vektor pFR5-TPI (Riffer, 1999) exprimiert in der Hefe *S. cerevisiae* SEY6210 mitgeführt. Diese K28-Toxin-Variante enthält eine Arginin zu Glycin Mutation an Positin 328 in der β -Untereinheit, was zu einer stark verminderten Sekretion der Toxinvariante führt (Abbildung 35b) und sich ebenfalls in einer verminderten Toxizität äussert (Ergebnis nicht dargestellt).

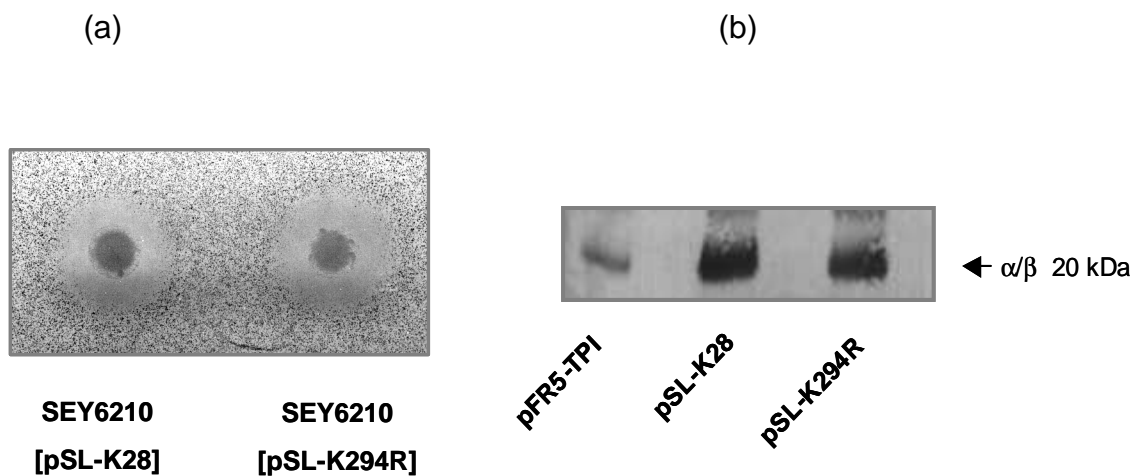


Abbildung 35: Vergleichende Aktivität und Sekretion von Wildtypotoxin und einer K28-K294R-Variante

Die mit den Vektoren pSL-K294R und pSL-K28 transformierte Hefe *S. cerevisiae* SEY6210 wurden im Leu-d/o-Agardiffusionstest gegen die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192-2d [pYX242] auf Expression eines Killerphänotyps getestet (a) sowie nach SDS-PAGE und Western Blot auf Toxinsekretion untersucht (b). Die SDS-PAGE erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen SDS-Tris/Tricinel. Als zusätzliche Referenz wurde Kulturüberstand einer weiteren Toxinvariante der produzierenden Hefe SEY6210 [pFR5-TPI] aufgetragen.

3.3.17 Untersuchungen zur Stabilität von Wildtyp-Toxin und mutiertem Toxin (K294R) im Zytosol toxinbehandelter Zellen

Um zu untersuchen, ob der Aminosäureaustausch Lys→Arg innerhalb der Toxin- β -Untereinheit dazu führt, daß das Toxin nicht mehr auf dem korrekten Weg die sensitive Zelle passiert, wurde der sensitive Hefestamm RH448 mit dem α/β -K294R-Toxinkonzentrat inkubiert und anschließend einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Im darauf folgenden Western Blot (Abbildung 36) konnte Toxin in allen intrazellulären Fraktionen nachgewiesen werden (Spuren 1-3), was zeigt, dass die Mutation innerhalb der β -Untereinheit keinen Einfluß auf den Transport des K294R-Toxins hat.



Abbildung 36: Western Blot zum Nachweis von K28-Toxin in subzellulären Fraktionen von *S. cerevisiae* RH448 nach Inkubation mit Toxinkonzentrat der Toxinvariante K28-K294R bei 30°C.

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen anti- β -Antikörper.

P2: ER-Membranen, Plasmamembranen, vakuoläre Membranen, Mitochondrien

P3: Endosomen, Vesikel, Golgi Membranen

C: zytosolische Fraktion

3.3.18 Untersuchungen zur Ubiquitinierung von Wildtyp-Toxin und einer Lysin-freien Variante (K28-K0) im Zytosol toxinbehandelter Hefezellen

Eisfeld konnte bereits in ihrer Dissertation zeigen, dass die β -Untereinheit des K28-Wildtyp-Toxins im Zytosol sensitiver Zellen ubiquitiniert vorliegt. Die α -Untereinheit bleibt von dieser Modifikation unberührt (Eisfeld, 2001). Die Ubiquitinierung der β -Untereinheit erfolgt erst nachdem das Toxin das Zytosol erreicht hat und dort in seine beiden Untereinheiten zerfallen ist. Die Toxin-Ubiquitinierung scheint nicht für den ER-Export benötigt zu werden. Um diese These experimentell zu überprüfen, wurde eine Toxin-Variante hergestellt, in der alle vier Lysin-Reste (Position 74, 135, 139, 294) der α - und β -Untereinheit gegen Arginin-Reste ausgetauscht wurden (Sendzig, 2006). Das mutierte Toxin K28-K0 wies im Vergleich zum Wildtyp-Toxin gleiche Toxizität auf. Zellfraktionierungsexperimente an Hefen, die mit dem Wildtyp-Toxin oder der K28-K0-Toxinvariante behandelt wurden zeigten, dass das Toxin-Heterodimer in beiden Fällen im Zytosol detektierbar war (Heiligenstein *et al.*, 2006).

Um eine Ubiquitinierung des K28-K0-Toxins nachzuweisen, wurden die zytosolischen Fraktionen der mit K28-K0-Toxin-behandelten Zellen und unbehandelten Zellen des Stammes *S. cerevisiae* RH448 im Western Blot mit einem anti- β -Antikörpers und einem anti-Ubiquitin-Antikörper analysiert. In Abbildung 37 ist zu sehen, daß in K28-K0-behandelten Zellen keine toxinspezifischen Ubiquitin-Signale auftraten. Es kann deshalb gefolgert werden, dass eine Toxin-Ubiquitinierung nicht benötigt wird, um K28 aus dem ER zu extrahieren.

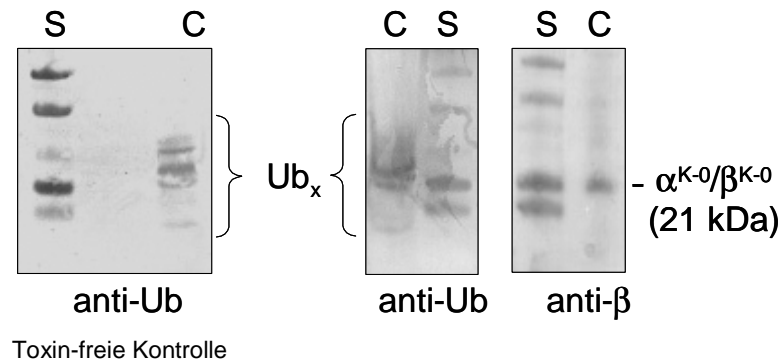


Abbildung 37: Western Blot zum Nachweis einer Ubiquitinierung von K28-Toxin in subzellulären Fraktionen von *S. cerevisiae* RH448 nach Inkubation mit Toxinkonzentrat der Toxinvariante K28-K0 bei 30°C.

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen anti- β -Antikörper und einem polyklonalen anti-Ub-Antikörper

C: zytosolische Fraktion

S: Proteinstandardart

4 Diskussion

Das K28-Toxin der Hefe *S. cerevisiae* zeigt in Hinsicht auf seine Produktion, Prozessierung und Sekretion Übereinstimmungen mit den eingehend charakterisierten Killertoxinen K1 und K2. Jedoch unterscheidet es sich in seinem Wirkungsmechanismus von diesen. K1 und K2 bewirken eine Veränderung der Membranpermeabilität. K28 hingegen löst ähnlich wie die Toxine von *Kluyveromyces lactis* und *Pichia acaciae* einen Zellzyklusarrest in einer sensitiven Zelle aus (Butler *et al.*, 1994; McCracken *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1996).

Das heterodimere K28-Toxin, das starke Ähnlichkeiten in Struktur und Wirkung mit der Familie der bakteriellen AB-Proteintoxine aufweist, verfügt über eine Untereinheit, die in die Transportprozesse involviert ist (K28- β) und eine katalytisch aktive Untereinheit, die für die Etablierung der Toxizität verantwortlich ist (K28- α). Das reife Toxin wird durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert und gelangt über den Sekretionsweg via Golgi und ER retrograd ins Zytosol. Für den retrograden Transport ist das am β -C-Terminus lokalisierte ER-Retentionssignal (HDEL) verantwortlich. Der Transfer vom ER-Lumen in das Zytosol erfolgt über einen Transportkanal (sec61p), der normalerweise für den Import sekretorischer Proteine in das ER-Lumen sowie für den Export falsch gefalteter Proteine zurück ins Zytosol genutzt wird. Im Zytosol wird die β -Untereinheit ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, während die α -Untereinheit in den Zellkern diffundiert und zellzyklusregulierende Proteine inaktiviert (Eisfeld *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2005).

4.1 Die Endozytose des K28-Toxins

Die Endozytose extrazellulärer Partikel oder Moleküle kann in zwei Arten, die „fluid phase“ und die Rezeptor-vermittelte Endozytose, unterteilt werden, je nachdem, ob die Partikel oder Moleküle frei oder an einen speziellen Zelloberflächen-Rezeptor gebunden aufgenommen werden. Riezman konnte als Erster die Existenz der Endozytose in der Hefe *S. cerevisiae* mit dem Fluoreszenz-Farbstoff „Lucifer Yellow“ (LY), der als „fluid phase“-Marker eingesetzt wird, nachweisen (Riezman, 1985). LY wurde internalisiert und akkumulierte in der Vakuole.

Ein Beispiel für rezeptorvermittelte Endozytose ist die Aufnahme des α -Faktors (gebildet von haploiden Zellen des α -Paarungstyps). Untersuchungen zeigten, dass dieser nach Bindung an den spezifischen α -Faktor Rezeptor (Ste2p) auf der Oberfläche haploider Zellen des α -Paarungstyps durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wird (Chvatchko *et al.*, 1986; Jenness and Spatrack, 1986).

Die Endozytose ist ein energie- und zeitabhängiger Prozess und kann deshalb in Zellen durch metabolische Inhibitoren oder durch Inkubation bei niedrigen Temperaturen blockiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Zellfraktionierungsexperimenten gezeigt werden, dass die Aufnahme des K28-Toxins in eine sensitive Zelle temperatur- und auch energieabhängig erfolgt. Hierbei wurde bestätigt, dass das K28-Toxin in Wildtyp-Zellen bei einer Temperatur von 20°C in allen intrazellulären Fraktionen nachweisbar war, wodurch gefolgert werden kann, dass das Toxin endozytotisch aufgenommen wird und über mehrere intrazelluläre Kompartimente schließlich in das Zytosol der sensitiven Zielzelle gelangt. In Wildtyp-Zellen dagegen, die bei 4°C oder in Anwesenheit eines matabolischen Inhibitors mit Toxinkonzentrat inkubiert wurden, war das Toxin weder in der zytosolischen Fraktion detektierbar noch in der Fraktion, die endozytotische Vesikel, Golgi Membranen und Transportvesikel enthielt. Das Toxin scheint demnach unter Endozytose-blockierenden Bedingungen an die Zellwand und an die Plasmamembran zu binden und nicht mehr internalisiert zu werden.

Die bakteriellen AB-Toxine werden über verschiedene endozytotische Mechanismen aufgenommen. Während eine Vielzahl der Toxine nach der Endozytose über Endosomen zum TGN und ER geleitet werden, von wo aus sie das Zytosol erreichen, werden einige direkt nach der Endozytose über Endosomen ins Zytosol geschleust. Dieser Prozess der Translokation eines Toxins über die Membran eines Endosoms, welche einen niedrigen pH benötigt, ist für das Diphtherie-Toxin am besten verstanden. Die A- und die B-Untereinheit des Toxins entfalten sich bei niedrigem pH (Blewitt *et al.*, 1985), was zu einer Exposition hydrophober Domänen führt, die eine erhöhte Tendenz zeigen, mit Membranlipiden zu interagieren (Montecucco *et al.*, 1985; Sandvig and Olsnes, 1981). Dadurch wird eine direkte Translokation der A-Untereinheit in das Zytosol ausgelöst (Draper and Simon, 1980; Sandvig and Olsnes, 1980) und die Proteinsynthese inhibiert (Hudson and Neville, 1985). Verschiedene Substanzen, die den endosomalen pH erhöhen, wie die Ionophore Monensin und Nigericin oder das schwache Amin Ammoniumchlorid, schützen sensitive Zellen vor Diphtherie-Toxin. Obwohl Eisfeld (2001) bereits zeigen konnte, dass das K28-Toxin retrograd über TGN und ER in das Zytosol gelangt, sollte ausgeschlossen werden, dass das Toxin den diesbezüglichen Eintritt in das Zytosol eventuell über azidische Vesikel nimmt. Hierzu wurde eine Inkubation von sensitiven Hefen mit K28-Toxin und Ammoniumchlorid durchgeführt. In Zellfraktionierungsexperimenten und Methylenblau-Agar-Diffusionstests ergab sich keine Schutzwirkung gegen das Toxin, womit ausgeschlossen werden kann, dass K28 direkt über Endosomen in das Zytosol gelangt.

4.1.1 Der HDEL-Rezeptor Erd2p ist der Plasmamembran-Rezeptor des viralen K28-Toxins

Rezeptoren für Toxine können verschiedener Natur sein. Die Bindung kann an ein spezifisches Protein, an Glykolipide, Ganglioside oder Glykoproteine erfolgen. In Tabelle 22 sind Toxine und ihre entsprechenden Rezeptoren an den Plasmamembranen aufgeführt.

Tabelle 22: Toxine und ihre Plasmamembran-Rezeptoren

Toxin	Organismus	Plasmamembran-Rezeptor	Referenz
Exotoxin A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	α_2 -macroglobulin receptor	Kounnas <i>et al.</i> , 1992
Diphtherie-Toxin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	heparin-binding epidermal (EGF)-like growth factor precursor	Naglich <i>et al.</i> , 1992
Shiga-Toxin	<i>Shigella dysenteriae</i>	globotriasyl ceramide	Jacewicz <i>et al.</i> , 1986
Cholera-Toxin	<i>Vibrio cholerae</i>	ganglioside G _{M1}	van Heyningen, 1974
Enterotoxin	<i>Escherichia coli</i>	ganglioside G _{M1}	Griffiths <i>et al.</i> , 1986
Ricin B-Untereinheit	<i>Ricinus communis</i>	galactose specific lectin	Lord <i>et al.</i> , 1994

Ergebnisse von Eisfeld (2001) und Spindler (2004) weisen darauf hin, dass die Aufnahme des K28-Toxins über einen Membranrezeptor verläuft. Dafür spricht die Beobachtung, dass das Toxin bereits zehn Minuten nach Toxinbehandlung im Zytosol der sensitiven Zielzelle nachweisbar ist und dass das intrazelluläre K28-Signal im Zytosol bereits nach 30 Minuten seine maximale Stärke erreicht (Eisfeld, 2001). Dies steht in Übereinstimmung mit der Kinetik der rezeptorvermittelten Endozytose und dem retrograden Transport der Cholera-Toxin A-Untereinheit, die 30 bis 90 Minuten nach der Internalisierung im ER der Zielzelle detektierbar ist (Majoul *et al.*, 1996). Shiga-Toxin sowie die ein KDEL-Motiv tragende Shiga-Toxin B-Untereinheit sind ebenfalls innerhalb von 30 bis 60 Minuten im ER nachweisbar (Sandvig *et al.*, 1992; Sandvig *et al.*, 1994).

In der Hefe werden Rezeptoren oder Transporter als Antwort auf einen äußeren Stimulus mit einer Halbwertszeit von weniger als 20 Minuten abgebaut (Hicke and Riezman, 1996). Der α -Faktor-Rezeptor Ste2p wird bei 24°C innerhalb von sechs bis acht Minuten nach Bindung seines Liganden zu 50% internalisiert (Geli and Riezman, 1996; Munn and Riezman, 1994).

Ein potenzieller Membranrezeptor für das K28-Toxin konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Es besteht jedoch schon seit längerem die Vermutung, dass der HDEL-Rezeptor nicht nur für den retrograden Transport, sondern auch für die endozytotische Aufnahme des Toxins verantwortlich sein könnte. Diese Vermutung wird durch verschiedene Untersuchungsergebnisse gestützt.

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose unterliegt die Aufnahme der Partikel oder Moleküle, die auch als Liganden bezeichnet werden, einer Sättigung, da sie von der Bindung des Liganden an den Rezeptor abhängig ist und nur der Komplex aus Ligand und Rezeptor aufgenommen werden kann.

Eisfeld (2001) unternahm Wettbewerbsstudien zur Untersuchung dieses Effektes. Allerdings waren die eingesetzten HDEL-Peptide bzw. hitzeinaktiviertes K28-Toxin nicht in der Lage, sensitive Hefen vor der K28-Toxinwirkung zu schützen. Aus diesen Untersuchungen wurde gefolgert, dass für die Vermittlung der toxischen Wirkung nicht nur das HDEL-Motiv des

Toxins, sondern auch dessen Exposition sowie wahrscheinlich auch die dreidimensionale Struktur des Toxins eine entscheidende Rolle spielen. Um diesen Faktor in die Untersuchungen einzubeziehen, wurden von Spindler (2004) Fusionskonstrukte erstellt, die aus den einzelnen Untereinheiten von K28, GFP und jeweils mit oder ohne C-terminalem HDEL-Signal bestanden. Die Proteine $\alpha\text{GFP}^{\text{HDEL}}$, $\text{GFP}\beta^{\text{HDEL}}$ und GFP^{HDEL} wurden dabei eindeutig von Zellen internalisiert, die HDEL-freien Derivate αGFP , $\text{GFP}\beta$ und GFP dagegen nicht. Der Unterschied zwischen den Proteinfusionen, die internalisiert wurden, lag nur im C-terminalen Tetrapeptid HDEL. Zudem schien es dabei keine Rolle zu spielen, ob eine der beiden oder beide Toxin-Untereinheiten vorhanden waren. Nachdem durch ortsspezifische Mutagenese gezeigt werden konnte, dass auch das SWG-Motiv an Position 16-18 der α -Untereinheit keine Bedeutung für die endozytische Aufnahme hat, konnte auch die Vermutung ausgeräumt werden, dass der α -Untereinheit eine zusätzliche Rolle bei der Zellinvasion zukommt (Eisfeld, 2001). Es ist zu vermuten, dass HDEL-Peptide alleine nicht aufgenommen werden können, jedoch das Tetrapeptid, anfusioniert an ein Protein jeglicher Art, in der Lage ist, dessen Aufnahme in die Zelle zu vermitteln. Cappel (2006) konnte zeigen, dass HDEL-maskierte Toxinvarianten ($\alpha\beta^{\text{HDELR-Strep}}$, $\alpha\beta^{\text{HDELR-Flag}}$) eine höhere Aktivität aufwiesen als K28-Derivate, die unmittelbar vor der HDEL-Sequenz ($\alpha\beta^{\text{Strep-HDEL}}$, $\alpha\beta^{\text{Flag-HDEL}}$) markiert waren. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass für die Bindung an den HDEL-Rezeptor Erd2p einzig und allein die HDEL-Sequenz verantwortlich ist und dass es dabei keine Rolle spielt ob diese frei zugänglich am Terminus eines Proteins oder innerhalb einer Protein-Sequenz liegt. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Proteinstruktur, die das Tetrapeptid in einer Proteinsequenz ausbildet, ausschlaggebend für dessen Bindungsfähigkeit ist.

Ein Einfluss des HDEL-Rezeptors (Erd2p) auf diese Sequenz-abhängige Endozytose der GFP-Fusionskonstrukte konnte anhand einer Δerd2 Mutante nachgewiesen werden, die nicht mehr in der Lage war, GFP-Konstrukte, welche mit einem C-terminalen HDEL-Tag versehen waren,

zu internalisieren. Auch Zellfraktionierungen einer mit GFP^{HDEL} behandelten $\Delta end3$ Mutante zeigten, dass die Aufnahme der HDEL-Fusionen ein von klassischen Endozytosewegen abhängiger Prozess ist. Bei End3p handelt es sich um ein Endozytose-relevantes Protein, das von Riezman und Mitarbeitern als eines der ersten für die Endozytose essenziell identifiziert wurde (Raths *et al.*, 1993). Weitere Hinweise für die Lokalisierung des HDEL-Rezeptors in der Zellmembran erbrachte eine Bindungsstudie mit sphäroplastierten Hefen, die zeigte, dass unter Bedingungen einer Endozytose-Blockade bei 4°C, bei gleichzeitiger Überexpression des HDEL-Rezeptors, deutlich mehr K28-Toxin von den Zellen gebunden wurde als bei Wildtyp-Zellen bei 4°C (Spindler, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Vorhandensein des HDEL-Rezeptors in der Plasmamembran untermauert werden. Durch eine Erhöhung der Menge an Erd2p in einer Zelle, kann diese deutlich mehr K28-Toxin aufnehmen. Dies belegen Versuche, in denen Hefen, die Erd2p zusätzlich zum zelleigenen Erd2p plasmidgetrieben überexprimierten, über die Zeit imstande waren, deutlich mehr Toxin aufzunehmen. Da dieser Effekt auch durch einen, durch den HDEL-Rezeptor gesteigerten Golgi/ER-Transport ausgelöst werden könnte, stellt dies noch keinen Beweis für das Vorhandensein von Erd2p in der Plasmamembran dar. Darum wurde zusätzlich untersucht, ob eine $\Delta erd2$ Mutante überhaupt in der Lage ist, Toxin in die Zelle aufzunehmen. Mentges (1997) konnte bereits im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigen, dass sich eine $\Delta erd2$ Mutante toxinresistent verhält. Eine plasmidgetriebene Überexpression des *ERD2* Gens führte dazu, dass die ursprünglich K28-resistente $\Delta erd2$ Mutante wieder eine deutliche Toxin-Sensitivität zeigte.

Toxinaufnahmestudien der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine $\Delta erd2$ Deletionsmutante über die gesamte Versuchsdauer von fünf Stunden hinweg nicht unfähig war, Toxin zu internalisieren. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die mit *ERD2* rücktransformierte $\Delta erd2$ Deletionsmutante Toxin im gleichen Maße wie ein Wildtypstamm internalisierte. Folglich ist der Erd2p-Rezeptor für die Endozytose des K28-Toxins verantwortlich.

Um diese Behauptung abzusichern, fehlte bislang der Nachweis des Erd2-Proteins *in vivo* in der Plasmamembran der Hefe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Fusionsproteine erstellt, die am C-terminalen Ende von Erd2p ein c-Myc-Tag bzw. GFP enthielten. Nach Konstruktion und Überprüfung dieser Konstrukte auf Funktionalität sollte eine Detektion der Fusionsproteine über Fluoreszenzmikroskopie bzw. indirekte Immunfluoreszenz erfolgen. Sowohl die Fluoreszenzmikroskopie von Hefen, die das Erd2p-GFP-Konstrukt überexprimierten, als auch die indirekte Immunfluoreszenz des Erd2-cmyc-Konstruktes zeigten Erd2p über die ganze Zelle verteilt, teilweise in Membransystemen, teilweise auch in Vesikeln. Dies steht in Übereinstimmung mit der Lokalisation des α -Faktor-Transporters (Ste6p) in Wildtyphefen, die durch indirekte Immunfluoreszenz an überexprimiertem Ste6p^{HA} gemacht wurde. Dieses punktierte Verteilungsmuster lässt vermuten, dass die meisten der Erd2p- oder Ste6p-Moleküle auf ihrem Weg zur oder von der Plasmamembran sind (Berkower *et al.*, 1994). Kuchler und Mitarbeiter (1993) konnten dieses Verteilungsmuster ebenfalls anhand eines Ste6p-cmyc-Konstruktes nachweisen und interpretierten dieses Muster bereits als einen Nachweis für das Vorhandensein von Ste6p in der Plasmamembran. Eine Akkumulation von Erd2p in der Plasmamembran konnte durch eine Blockierung der Endozytose erreicht werden. Im Gegensatz zur punktierten Verteilung von Erd2p im Wildtyp zeigte sich in einer Endozytose-defekten $\Delta end3$ Mutante eine ringförmige Verteilung um die Zelle herum, die mit der Verteilung der Plasmamembran-ATPase Pma1p übereinstimmt. Das gleiche Ergebnis wurde auch für Ste6p erhalten (Berkower *et al.*, 1994). Damit konnte zum ersten Mal bei Hefezellen mit einem Defekt in der frühen Endozytose bei einer Überexpression der HDEL-Rezeptor in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Allerdings konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen kein direkter Nachweis erbracht werden, dass Erd2p unter Normalbedingungen in der Plasmamembran in Wildtyp-Zellen vorkommt. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, die Liu und Mitarbeiter (2007) an der P4-ATPase Drs2p machen konnten. Drs2p ist im hefeeigenen trans-Golgi Netzwerk ansässig und für den Vesikel-getriebenen

Proteintransport aus diesem Organell verantwortlich. In Wildtyp-Zellen akkumuliert Drs2p an der Plasmamembran, wenn Endozytosemechanismen inaktiviert werden. Die direkte Inaktivierung der Endozytose durch Latrunculin A verursacht eine sehr langsame Akkumulation von Drs2p, die etwa drei Stunden dauert. Dies lässt darauf schließen, dass Drs2p ineffektiv in exozytotische Vesikel eingeschlossen wird und sehr schnell nach dem Erreichen der Plasmamembran wieder endozytotisch aufgenommen wird. Dieser langsame Transport zur Plasmamembran und die schnelle Endozytose führen zu einer nicht nachweisbaren Menge an Drs2p in der Plasmamembran von Wildtyp-Zellen, solange die Endozytose nicht inhibiert ist (Liu *et al.*, 2007).

Bisherige Untersuchungen erbrachten eine Lokalisation des HDEL- bzw. des humanen KDEL-Rezeptors im Lumen und in den Membranen von Golgi und ER (Lewis and Pelham, 1990; Semenza *et al.*, 1990). Griffiths und Mitarbeiter konnten durch Immunogold-Elektronenmikroskopie nachweisen, dass die Induktion verschiedener Stressbedingungen wie virale Infektionen oder eine Temperaturerhöhung eine signifikante Umverteilung des KDEL-Rezeptors zum Trans-Golgi-Netzwerk bewirkte. Da das TGN die Schnittstelle zwischen sekretorischem und endozytotischem Weg in der Zelle darstellt, wird vermutet, dass das Vorhandensein des KDEL-Rezeptors eine funktionelle Rolle spielt. Die Lokalisation des KDEL-Rezeptors ermöglicht dabei die Aufnahme von Toxinen, die an ihrem C-Terminus eine KDEL- oder KDEL-ähnliche Sequenz besitzen (Chaudhary *et al.*, 1990; Pastan *et al.*, 1992). Die Lokalisation des KDEL-Rezeptors im TGN unterstützt die Annahme, dass der KDEL-Rezeptor für den Transport der Toxine aus dem TGN ins ER verantwortlich ist (Pastan *et al.*, 1992). Untersuchungen von Sandvig (1992) zeigten, dass endozytotisch aufgenommenes Shiga-Toxin direkt durch das TGN und den Golgi zum ER transportiert wird.

Andere Untersuchungen zeigen, dass in Säugerzellen einige KDEL-Sequenz-tragende Proteine, wie BiP und Calreticulin an der Säuger-Plasmamembran lokalisiert wurden (Wiest *et al.*, 1997). Diese KDEL-Proteine scheinen mit anderen Proteinen zu assoziieren, die ebenfalls aus dem ER stammen. Obwohl die biologische Relevanz dieser Lokalisation

noch nicht verstanden ist, konnte bei einigen KDEL-Proteinen wie Calreticulin belegt werden, dass diese bestimmte Funktionen außerhalb des ER's erfüllen. Calreticulin ist normalerweise für die korrekte Proteinfaltung im ER zuständig; ist es aber auf der Plasmamembran lokalisiert, fungiert es als Rezeptor für Fibrinogen (Gray *et al.*, 1995). Da es also möglich ist, dass Proteine, die eigentlich im ER ansässig sind an die Plasmamembran gelangen und dort auch funktionell aktiv sind, ist es durchaus denkbar, dass dies auch für den KDEL/HDEL-Rezeptor gilt, um ER-Proteine ins das endoplasmatische Retikulum zurückzuführen oder andere Funktionen zu erfüllen.

Gagnon und Mitarbeiter (2002) konnten beweisen, dass in Säugerzellen bei der Phagozytose nicht die Plasmamembran, sondern das ER Membranmaterial bereitstellt. Proteom-Analysen hochaufgereinigter Phagosomen zeigten das Vorhandensein einiger ER Proteine. Weitere Untersuchungen stellten fest, dass das ER zur Zelloberfläche rekrutiert wird, dort mit der Plasmamembran verschmilzt und an der Ausbildung von Phagosomen beteiligt ist. Dieser Prozess wird als „ER-vermittelte Phagocytose“ bezeichnet (Desjardins, 2003). Dies scheint als Ausgleich zu dienen, um den „Membran-Haushalt“ der Zelle aufrechtzuerhalten und nicht zu viel Oberflächenmaterial zu verlieren (Watts, 2002).

4.1.2 Erd2p besitzt das Endozytosesignal NPF

Proteine der Plasmamembran können durch Endozytose wieder aufgenommen werden und gelangen schließlich in Lysosomen bzw. in die Vakuole, wo ihr Abbau erfolgt.

Es existieren zwei Arten von Plasmamembranproteinen. Eine Klasse bilden die beiden G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembranezeptoren der Hefe-Pheromone: der α -Faktor-Rezeptor (Ste2p) und der a-Faktor-Rezeptor (Ste3p). Die zweite Klasse besteht aus zwei Transportern der ABC-Transporter-Familie, dem a-Faktor-Transporter (Ste6p) und dem „Multidrug“-Transporter (Pdr5p), sowie aus einer Reihe von Transportern aus

der MFS-Familie, darunter z.B. die Uracil-Permease Fur4p und die Aminosäure-Permease Gap1p.

Die Plasmamembran-Transporter der Hefe spielen eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Wachstumsrate. Die meisten von ihnen unterliegen einer konstitutiven und auch induzierten Endozytose, die durch verschiedene Faktoren wie Nahrungsüberschuss, Verfügbarkeit von Nährstoffen oder auch Stressbedingungen gesteuert werden.

In Hefe existieren zwei Arten von Endozytose-Signalen, die Proteine in den Clathrin/Aktin-vermittelten Endozytoseweg einschleusen. Bei diesen handelt es sich um eine sogenannte PEST-ähnliche Sequenz, die eine Phosphorylierung und Ubiquitinierung des Cargo-Proteins vermittelt und das NPFXD-Motiv, das spezifisch durch Sla1p, eine Untereinheit des endozytotischen „coat“ Komplexes, gebunden wird (Hicke and Dunn, 2003; Rotin *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 1996).

Analysen der Proteinsequenz von Erd2p mit dem Programm PESTfinder (EMBnet Austria) ergaben, dass weder eine potentielle noch eine schwache PEST-Sequenz vorhanden ist (Ergebnis nicht dargestellt).

Allerdings besitzt Erd2p ein aminoterminaleres NPF-Motiv, welches ein Endozytosesignal darstellen könnte. Das NPFXD-Signal wurde erstmals in der Furin-ähnlichen Protease Kex2p entdeckt (Tan *et al.*, 1996). Kex2p zirkuliert zwischen dem Golgi-Kompartiment und Endosomen, ohne normalerweise die Zelloberfläche zu erreichen (Wilcox *et al.*, 1992). Trotzdem vermittelt die zytoplasmatische Domäne von Kex2p, anfusioniert an eine inaktive Form des α -Faktor Rezeptors Ste2p, diesem eine rasche endozytotische Aufnahme (Tan *et al.*, 1996). Mutationsanalysen des chimeren Ste2/Kex2p-Proteins offenbarten, dass die Sequenz NPFSD als das endozytotische Zielsignal wirkt. Die Charakterisierung einer ähnlichen Sequenz, der in Ste3p (α -Faktor Rezeptor) natürlich vorkommenden NPFSTD, führte dazu, dass die Sequenz NPF_{X(1,2)}D als Motiv für die schnelle Internalisierung eines integralen Membranproteins definiert wurde. Das NPFXD-Motiv zeigt starke Ähnlichkeiten zum NPXY-Motiv des Säugers. Beide Motive können die Clathrin-abhängige Aufnahme in eine Zelle vermitteln (Tan *et al.*, 1996). Tan und Mitarbeiter (1996) konnten ebenfalls

nachweisen, dass die verkürzte Sequenz NPF in Ste3p hinreichend und notwendig für die Aufnahme des α -Faktor-Rezeptors ist. Ein Austausch der Sequenz NPF durch die Sequenz APA führte zu einem Endozytoseblock. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten belegen, dass das Vorhandensein von Sla1p, dem spezifischen Bindepartner der NPF-Sequenz, notwendig für die Aufnahme des K28-Toxins ist. Eine $\Delta sla1$ -Knock-out-Mutante verhielt sich im Methylenblau-Agar-Diffusionstest komplett resistent gegen K28-Toxin. Dies kann als weitere Bestätigung dafür angesehen werden, dass Erd2p der Membranrezeptor für K28 ist und dass dessen NPF-Motiv als Endozytosesignal fungiert. Dausend untersuchte 2006 die Relevanz des NPF-Motivs von Erd2p auf die Endozytose von K28. Dabei wurde in Erd2p die Sequenz NPF gegen NIF ausgetauscht. Hefen, die die Erd2-NIF-Variante exprimierten, zeigten keine Abweichungen bei der Internalisierung des Toxins im Vergleich zum Wildtyp. Pfluger und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass in den Homologen zum Hefe-eigenen HDEL-Rezeptor in *Plasmodium falciparum*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* und *Drosophila melanogaster* das N-terminale NPF-Motiv in Form von NIF vorliegt. Gleichwohl die Endozytose, vermittelt über die Sequenz NIF, noch nicht beschrieben wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese ebenfalls in der Lage ist, eine Internalisierung auszulösen. Ein Austausch der NPF-Sequenz in Erd2p gegen APA wäre deshalb zu untersuchen.

4.1.3 Die Ubiquitinierung durch die Enzyme Ubc4p und Rsp5p regulieren die Endozytose von K28

Untersuchungen an den Plasmamembranproteinen Ste2p, Ste3p und Fur4p haben gezeigt, dass deren Internalisierung eine Reihe von Modifikationen vorausgeht, die als „PURE-Pathway“ („Phosphorylation, Ubiquitination, Recognition by endocytotic machinery and Endocytosis“) bezeichnet werden (Kelm *et al.*, 2004). Die Abfolge von Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Erkennung durch die Endozytose-Maschinerie leiten in diesem Modell die Endozytose ein. Die internalisierten Membranproteine werden zum frühen Endosom verbracht, wo sie in Vesikel verpackt und schließlich in der Vakuole abgebaut werden.

Die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen scheint durch die Phosphorylierung positiv reguliert zu werden. Das Protein Ste2p wird bei Kontakt mit Pheromon phosphoryliert. In einer verkürzten Version dieses α -Faktor-Rezeptors werden drei Serine, die für die Phosphorylierung des C-terminalen Teils benötigt werden, auch für die Ubiquitinierung und den raschen Abbau gebraucht (Hicke and Riezman, 1996). Ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Aufnahme von der Zelloberfläche wurde u.a. für die Proteine Ste3p (α -Faktor-Rezeptor) und Fur4p (Uracil-Permease) gezeigt (Marchal *et al.*, 1998). Untersuchungen an den Proteinen Ste2p, Ste3p, Fur4p und Pdr5p wiesen einen direkten oder indirekten Einfluss der Ser/Thr-spezifischen Protein-Kinasen Yck1p und Yck2p auf die Phosphorylierung dieser Proteine nach (Decottignies *et al.*, 1999; Hicke *et al.*, 1998; Panek *et al.*, 1997). Der Einfluss der ähnlichen und funktionell austauschbaren Kinasen auf die Endozytose des K28-Toxins wurde anhand der $\Delta yck1$ und $\Delta yck2$ Mutanten untersucht. Beide verhielten sich sensitiv gegen K28-Toxin (siehe Tabelle 23). Da sich beide Kinasen gegenseitig ersetzen können, müsste, um deren Einfluss auf den K28-Wirkungsmechanismus feststellen zu können, eine temperatursensitive Doppelmutante ($yck1\Delta yck2-2ts$) untersucht werden (Kelm *et al.*, 2004).

Die Ubiquitinierung spielt als Regulator der Endozytose und des endosomalen Transports eine entscheidende Rolle. Ubiquitin ist ein kleines aus 76 Aminosäuren bestehendes Peptid, das in allen eukaryotischen Organismen und Zelltypen gefunden werden kann. Es wird posttranslational durch eine Isopeptidbindung an einen oder mehrere Lysinreste eines Proteins geknüpft. Die Ubiquitinierung erfolgt durch die Aktivität dreier nacheinander wirkender Enzyme: der Ubiquitin-aktivierenden Enzyme (E1), der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) und der Ubiquitin-Protein Ligasen. (E3) Monoubiquitinierte Proteine können durch das Anhängen weiterer Ubiquitin-Moleküle an Lysinreste im Ubiquitin selbst (meist Lys48, oder Lys63) modifiziert werden. Proteine mit mehr als vier Ubiquitin-Einheiten, die über Lys48 miteinander verknüpft sind, werden gewöhnlich zum Proteasom gesteuert und abgebaut (Ciechanover and Schwartz, 1998). Die Verknüpfung von einem oder mehreren Ubiquitinresten, die über Lys63 miteinander

verbunden sind, konnte als Internalisierungssignal für Plasmamembranproteine identifiziert werden (Rotin *et al.*, 2000).

Rsp5p ist ein hefeeigenes E3-Enzym, das verantwortlich für die Ubiquitinierung aller Plasmamembranproteine der Hefe ist, die Ubiquitin als Internalisierungssignal nutzen (Rotin *et al.*, 2000). Rsp5p besteht unter anderem aus einer Protein- und Lipid-bindenden C2-Domäne, aus einer HECT-Domäne, die für die katalytische Ubiquitin-Ligase-Aktivität verantwortlich ist, und aus drei WW-Domänen, die womöglich die Proteininteraktionen steuern (Dunn and Hicke, 2001). Die E2-Enzyme, die am besten in der Lage sind, Ubiquitin auf die HECT-Domäne von Rsp5p zu transferieren, sind Ubc4p und Ubc5p (Hatakeyama *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *rsp5* Mutanten, die defekt in der Formation von Thioester-Intermediaten (*rsp5-1*) oder der Aufnahme des α -Faktors (*rsp5-2*) sind, eine Resistenz gegen K28-Toxin bei restriktiver Temperatur ausbilden. Eisfeld (2001) konnte bereits belegen, dass sich eine *ubc4* Deletionsmutante vermindert sensitiv gegen K28, und alle getesteten Doppelmутanten (*ubc4/ubc6*, *ubc4/ubc7* und *ubc4/ubc1*) nahezu resistent verhielten. In Zellfraktionierungsexperimente der *rsp5-1* und Δ *ubc4* Mutanten war das Toxin nur in der Plasmamembran-Fraktion und weder in der Vesikel-, noch in der zytosolischen Fraktion nachzuweisen. Letztendlich konnte durch Toxinaufnahmestudien der vorliegenden Arbeit der endgültige Beweis erbracht werden, dass *rsp5-1* und Δ *ubc4* Mutanten nicht mehr in der Lage sind, K28-Toxin aufzunehmen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Plasmamembranrezeptor von K28 über das E2-Enzym Ubc4p und das E3-Enzym Rsp5p ubiquitiniert werden muss, um zusammen mit dem Toxin in die Zelle aufgenommen zu werden.

Da Rsp5p für fast alle Plasmamembranproteine der Hefe als E3-Enzym die Ubiquitinierung steuert (Rotin *et al.*, 2000), wurde ein Großteil dieser Proteine gegen K28 getestet, um auszuschließen, dass es sich bei diesen bekannten „Targets“ von Rsp5p um den Plasmamembranrezeptor von K28 handelt. Wie vermutet, wiesen diese allerdings eine normale Sensitivität gegen K28-Toxin auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

Als Membranrezeptor des K28-Toxins müsste der HDEL-Rezeptor Erd2p Motive für die Phosphorylierung und Ubiquitinierung aufweisen. Da die Topologie des hefeeigenen HDEL-Rezeptors nicht bekannt ist, er aber mit dem bovinen KDEL-Rezeptor eine Sequenzhomologie von identischen und biochemisch ähnlichen Aminosäuren von 65% zeigt, wurde das Modell des bovinen Rezeptors nach Singh (1998) für Erd2p übernommen (Dausend, 2006; Spindler, 2004).

Eine *in-silico*-Analyse des Erd2p-Rezeptors ergab sieben potentielle Phosphorylierungsstellen, die alle innerhalb von sehr wahrscheinlich zytoplasmatischen Sequenzbereichen gelegen sind darunter auch zwei Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase C, zu deren Typus die Kinasen Yck1p und Yck2p gehören. Mögliche Stellen zur Ubiquitinierung fanden sich gehäuft am C-Terminus des Proteins. Innerhalb eines Sequenzbereichs von 12 Aminosäuren sind vier Lysinreste vorhanden, die für zytosolische Enzyme der Ubiquitinierungsmaschinerie als Ubiquitin-Akzeptoren dienen können (Dausend, 2006).

Rsp5p als Ubiquitin-Ligase müsste in der Lage sein, Erd2p zu ubiquitinieren. Hierzu liegen allerdings bis jetzt noch keine Untersuchungen vor. Eine direkte Interaktion zwischen Zelloberflächenproteinen und Rsp5p sowie eine *in-vitro*-Ubiquitinierung dieser Proteine konnte noch nicht nachgewiesen werden. Bis jetzt sind auch noch keine Erkennungssequenzen für Rsp5p in diesen Membranproteinen bekannt. Neben seiner Rolle im Transport von Membranproteinen modifiziert Rsp5p noch eine Reihe weiterer Proteine, die an anderen zellulären Prozessen beteiligt sind (Beaudenon *et al.*, 1999; Hoppe *et al.*, 2000). Mga2p ist ein im ER lokalisierter Transkriptionsfaktor, der zusammen mit seinem Homologen Spt23p die Expression des *OLE1* Gens reguliert, das für die Synthese essenzieller Ölsäuren benötigt wird. Eine Proteasomen-abhängige Prozessierung dieser ER gebundenen, 120 kDa-großen Mga2- und Spt23-Proteine, führt zu transkriptionskompetenten 90 kDa Proteinen. Die Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p modifiziert beide Proteine und leitet so den partiellen Abbau ein. Untersuchungen von Shcherbik und Mitarbeitern (2004) zeigten, dass die zwei Transkriptionsfaktoren Spt23p und Mga2p ein LPKY-Motiv an ihrem C-

Terminus enthalten, welches für die Bindung von Rsp5p und die darauffolgende Ubiquitinierung verantwortlich ist. Der HDEL-Rezeptor Erd2p besitzt ebenfalls an seinem C-terminus ein LPK-Motiv, das als Erkennungssequenz für Rsp5p fungieren könnte (siehe Abbildung 38). Dieses Motiv stellt möglicherweise die Verbindung zwischen dem Membranrezeptor von K28 und der Ubiquitin-Ligase her.

1 MNPFRILGDLSHLTSILILIHNIKTTRYIEGISFKTQTLYALVFITRYLDLLTFHWSLY

61 NALMKIFFIVSTAIVVLLQSKRTNTIAYNEMLMHDTFKIQHLLIGSALMSVFFHHKFT

121 FLELAWSFSVWLESVAILPQLYMLSKGGKTRSLTVHYIFAMGLYRALYIPNWIWRYSTED

181 KKLDKIAFFAGLLQTLLYSDFFYIYYTKVIRGKGFKLPK

Abbildung 38: Aminosäuresequenz des HDEL-Rezeptors Erd2p

Doppelt unterstrichen sind die Endozytose-Signalsequenzen und die E3-Erkennungssequenz, die *in silico* identifiziert werden konnten. Einfach unterstrichen sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen und fett unterstrichen die potentiellen Ubiquitinierungsstellen in Erd2p (Dausend, 2006; Spindler, 2004). Die Topologie ist analog zu dem KDEL-Rezeptor nach Singh (1993) in roten Transmembrandomänen, blauen zytosolischen Domänen und grünen luminalen bzw. Außenbereichen dargestellt.

4.1.4 Die Endozytose von K28 ist abhängig von Clathrin und dem AP2-R-Komplex

Proteine, die endozytotisch aufgenommen werden sollen, werden in Vesikel verpackt. In Säugerzellen ist der bekannteste und am besten untersuchte Weg der rezeptorvermittelten Endozytose der über durch Clathrin gebildete „coated pits“ und „coated vesicles“ (Hirst and Robinson, 1998; Schmid, 1997). Clathrin-Vesikel bestehen aus drei großen (Clathrin schwere Kette) und drei kleineren (Clathrin leichte Kette) Polypeptidketten, die zusammen das Triskelion bilden. Mehrere dieser Gebilde lagern sich an der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Plasmamembran an und verbinden sich zu einem käfigähnlichen Netz aus Fünf- und Sechsecken. Auf diese Weise entsteht die aus Vielecken zusammengesetzte Hülle an der Oberfläche der „coated pits“ und „coated vesicles“ (Alberts *et al.*, 1990). Die Assemblierung der Clathrin-Hülle wird durch die Anwesenheit der heterotetrameren Adapter-Proteine unterstützt. Die Adapterproteine erkennen Sortierungssignale innerhalb der zytosolischen Bereiche der zu transportierenden Membranproteine und rekrutieren und binden Clathrin. Sie bilden somit die Verbindung zwischen

den zu transportierenden Proteinen und dem „coated pit“ (Kirchhausen, 2000). „Coated pits“ reifen zu „coated vesicles“, die in Säugerzellen zusammen mit der GTPase Dynamin von der Plasmamembran abgeschnürt werden.

Clathrin ist ein Proteinkomplex, der in der Evolution sehr konstant erhalten geblieben ist. Das Hefegenom enthält ein Gen für die schwere Kette von Clathrin (*CHC1*) und ein Gen für die leichte Kette (*CLC1*). Hefestämme, bei denen *CHC1* oder *CLC1* zerstört sind, sowie Stämme mit einem temperatursensitiven Allel der schweren Kette (*chc1-ts*) zeigen eine um die Hälfte reduzierte Internalisierung des α -Faktors und sind defekt in der Aufnahme des α -Faktor-Rezeptors Ste3p (Chu *et al.*, 1996; Clare *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1993). Dies beweist, dass Clathrin eine wichtige Rolle bei der Endozytose in Hefe spielt. Die Tatsache, dass der α -Faktor aber auch ohne die Anwesenheit von Clathrin in geringer Menge aufgenommen werden kann, lässt auf das Vorhandensein eines Clathrin-unabhängigen Weges schließen. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass sich die Internalisierung der Uracil-Permease Fur4p bei restriktiver Temperatur in einem *chc1ts* Stammhintergrund unbeeinflusst zeigt (A. Gratias and R. Haguener-Tsapis, unpublished data). Daraus kann gefolgert werden, dass eventuell ein zweites Protein in Hefe existiert, welches in der Lage ist, die Funktion von Clathrin zu ersetzen (Penalver *et al.*, 1999).

Für das K28-Toxin konnte nachgewiesen werden, dass sich eine $\Delta chc1$ Mutante resistent, im Gegensatz dazu aber eine $\Delta clc1$ Mutante sensitiv gegen K28-Toxin verhält. Die schwere Kette von Clathrin scheint bei der rezeptorvermittelten Endozytose von K28 eine essenzielle Rolle zu spielen. Das Fehlen der leichten Kette von Clathrin hat im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die Toxinaufnahme. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass, obwohl die leichte Kette Bestandteil des Triskelions ist, diese zur Bildung nicht benötigt wird, da die schwere Kette das strukturelle Rückgrat bildet (Liu *et al.*, 1995). Newpher (2005) konnte beweisen, dass Clathrin sehr wohl eine dynamische Komponente der Endozytose-Maschinerie in Hefe darstellt. Endozytotische Defekte von Clathrin-Mutanten führt er auf die

Funktionsunfähigkeit einiger endozytostischer Aufnahmestellen zurück oder auf partielle Effekte, die alle endozytostische Aufnahmestellen betreffen.

Die Rolle der leichten Kette von Clathrin ist noch nicht vollständig geklärt. Huang und Mitarbeiter (1997) konnten zeigen, dass in $\Delta clc1$ -Hefestämmen die schwere Kette auf 20-25% des normalen Gehaltes reduziert vorlag und dass nur ein geringer Anteil der schweren Kette trimerisierte. Für K28 könnte dies bedeuten, dass der geringe Anteil an Triskelions in einer $\Delta clc1$ Mutante ausreicht, um eine effektive Aufnahme zu ermöglichen, oder dass ein alternatives Protein die Rolle der leichten Kette übernimmt.

In Säugerzellen ist Clathrin bei der Bildung von Vesikeln auf die Funktion eines heteromeren Komplexes aus vier Proteinen, dem sogenannten Adaptor-Protein-Komplex (AP), angewiesen, der als Bindeglied zwischen Clathrin und Tyrosin-basierenden Signalen auf der zytosolischen Seite der Transmembranrezeptoren an der Vesikel-Formation beteiligt ist (Schmid, 1997). Jeder AP-Komplex besteht aus zwei großen (β und entweder α , γ , δ , oder ϵ), einer mittleren (μ) und einer kleinen Untereinheit (σ). Die vier unterschiedlichen Adaptor-Protein-Komplexe des Säugers unterscheiden sich aufgrund ihres Wirkungsortes in der Zelle voneinander. Zwei dieser AP'-Komplexe assoziieren mit Clathrin und sind an der Vesikelbildung beteiligt. Der AP-1-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten γ , $\beta 1$, $\mu 1$ und $\sigma 1$, ist am TGN lokalisiert, wo er für die Sortierung von Proteinen in den lysosomalen oder sekretorischen Weg verantwortlich ist, während der AP-2-Komplex, zusammengesetzt aus den Untereinheiten α , $\beta 2$, $\mu 2$ und $\sigma 2$, seine Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endozytose erfüllt.

Über Sequenzhomologien konnten AP-Untereinheiten auch in der Hefe gefunden werden, wobei diese in drei potentielle AP-Komplexe eingeteilt wurden (Yeung *et al.*, 1999).

Gegen K28 zeigten Mutanten der Komplexe AP-1 und AP-3 im Vergleich zum Wildtypstamm keine signifikanten Unterschiede in ihrer Toxinsensitivität. Jedoch wiesen alle Mutanten des AP2R-Komplexes ($\Delta apl1$, $\Delta apm4$, $\Delta aps2$) eine komplette Resistenz gegen K28-Toxin auf, mit Ausnahme der $\Delta apl3$ Mutante, die sich mit einem Hemmhofdurchmesser von 2 mm im MBA-Test nur noch minimal sensitiv verhielt. Diese Phänotypen gegen K28 sind die

einzig beschrieben, da alle bisher durchgeführten Deletionen in den verschiedenen Untereinheiten zu Wildtyp-Phänotypen führten (Yeung *et al.*, 1999). Deletionen im *APL2*-Gen (β -Untereinheit) und im *APS2*-Gen haben weder einen Einfluss auf die Aufnahme des α -Faktors noch verstärken sie den Aufnahmedefekt in einer *chc1^{ts}*-Mutante (Phan *et al.*, 1994; Rad *et al.*, 1995). Bei Untersuchungen zur Fähigkeit der Bindung von Clathrin an die hefeeigenen AP-Komplexe konnte festgestellt werden, dass nur die β -Untereinheit des AP1-Komplexes in der Lage war, Clathrin zu binden. Genetische Experimente, die Doppelmutanten nutzten, bei denen Deletionen der AP1-Untereinheiten mit einem *chc1*-Allel kombiniert wurden, wiesen nur geringe synthetische Effekte auf. Deletionen der AP2-Untereinheiten zeigten sogar keine synthetischen Effekte in Kombination mit einem Clathrin-Aktivitätsverlust (Rad *et al.*, 1995). Während diese Ergebnisse suggerieren, dass AP-2 in Hefe nicht an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt ist, besteht allerdings die Möglichkeit, dass andere endozytotische Proteine die Funktion von AP-2 maskieren. Alternativ ist AP-2 für die Endozytose nur einiger Proteine verantwortlich, die bis jetzt nicht direkt untersucht wurden.

Als weiterer Hinweis auf Unterschiede in der Endozytose von Hefe und Säugern kann das Fehlen von Säuger-spezifischen Internalisierungssignalen in Hefe angesehen werden (D'Hondt *et al.*, 2000; Geli and Riezman, 1996; Santolini *et al.*, 1999). Es ist möglich, dass der AP-2-Komplex in Hefe einen differenzierten und funktionell redundanten Proteinkomplex darstellt, der bei der Endozytose eine zentrale Rolle spielt. Anstatt eines heterotetrameren Adapterproteins, das die Selektion der Cargo-Proteine, anderer Adaptoren und Clathrin übernimmt, könnten in Hefe mehrere verschiedene Proteine diese Funktion innerhalb eines Komplexes oder im Austausch durch andere Proteine erfüllen (Baggett and Wendland, 2001).

Untersuchungen an Säugerzellen belegen, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose ohne den AP-2-Komplex stattfinden kann (Motley *et al.*, 2003; Traub, 2005). Alternative Adaptoren ersetzen beim Fehlen des AP-2-Komplexes dessen Funktion und assemblieren mit Clathrin, was für den EGF- und den LDL-Rezeptor gezeigt werden konnte. Jedoch gibt es Cargo-

Proteine wie den Transferrin-Rezeptor, der nur mit dem AP-2-Komplex interagieren kann und bei einer Deletion des Komplexes an der Zelloberfläche verbleibt (Motley *et al.*, 2003).

Coated Vesicles werden unter dem Einfluss der GTPase Dynamin von der Plasmamembran abgeschnürt. In Hefe existieren drei Dynamin-ähnliche Proteine (Vps1p, Dnm1p, Mgm1p), bei denen nur Dnm1p in die Endozytose involviert ist (Gammie *et al.*, 1995). Vps1p ist für Sortierungsschritte am Trans-Golgi verantwortlich und Mgm1p für die Erhaltung des mitochondrialen Genoms (Ekena *et al.*, 1993; Hermann and Shaw, 1998). Deletionen aller drei Gene ließen keinen Phänotyp bei extrazellulärer Applikation von K28-Toxin erkennen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, die zeigen, dass weder eine Deletion von *VPS1* noch von *DNM1* einen Einfluss auf die Aufnahme des α -Faktors hat (Gammie *et al.*, 1995; Munn and Riezman, 1994; Nothwehr *et al.*, 1995).

Proteintoxine, wie das K28-Toxin sind in der Lage, alle verfügbaren endozytotischen Wege für den Zelleintritt zu nutzen (Conner and Schmid, 2003). Das Pflanzentoxin Ricin zum Beispiel, welches an die gesamte Zelloberfläche bindet, da es sowohl Glykoproteine als auch Glykolipide mit terminaler Galactose als Bindungspartner nutzt, wird über den Weg der Clathrin-unabhängigen Endozytose aufgenommen (Sandvig *et al.*, 1987). Die Clathrin-unabhängige Endozytose kann wiederum abhängig oder unabhängig von sogenannten „lipid rafts“ (Plasmamembrandomänen, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind) und Dynamin ablaufen. So ist die Clathrin-unabhängige Aufnahme des Interleukin2-Rezeptors abhängig von „lipid rafts“, wohingegen Ricin und Cholera-Toxin ohne das Vorhandensein von Clathrin und Cholesterol internalisiert werden können (Rodal *et al.*, 1999; Sandvig *et al.*, 2004). Im Falle des Anthrax Toxins ist die Endozytose abhängig von „lipid rafts“ und resultiert in einem Clathrin-abhängigen Prozess (Abrami *et al.*, 2003). Eine Unterart der „lipid rafts“ sind die Caveolae, bei denen es sich um 50 - 100 Nanometer große, sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran handelt, die mit dem Protein Caveolin assoziiert sind. Caveolae sind normalerweise sehr stabile Strukturen, können aber bei der Aufnahme des Cholera-Toxins involviert sein (Sandvig and van

Deurs, 2005). Interessanterweise konnte von Pelkmans und Mitarbeitern (2004) gezeigt werden, dass Cholera-Toxin, welches über caveoläre Strukturen aufgenommen wird, schließlich in sauren Endosomen endet. Da die endozytotischen Kompartimente in der Lage sind, ihre zu transportierenden Inhalte untereinander auszutauschen, scheint es keine Rolle zu spielen, ob ein Ligand über Caveolae oder über Clathrin-besetzte Vesikel aufgenommen wird.

Wie zu erkennen ist, wird von Proteintoxinen jedmögliche Kombination der vorhandenen Endozytosewege genutzt, um das Zytosol einer sensitiven Zelle zu erreichen. Sie stellen deshalb willkommene Untersuchungsobjekte bei der Studie der Endozytosemaschinerie dar. Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass Toxine möglicherweise bestimmte Signalwege stimulieren, die den endozytotischen Prozess beeinflussen und deshalb unter diesen Bedingungen keine Prozesse, wie sie im Wildtyp ablaufen, beobachtet werden können (Sandvig *et al.*, 2004).

4.1.5 Das Aktin-Zytoskelett beeinflusst die Aufnahme von K28

Das Aktin Zytoskelett übt einen fundamentalen Einfluss auf die Endozytose in Hefe aus (Kubler and Riezman, 1993). Das Aktin Zytoskelett in Hefe besteht aus Aktinkabeln die aus F-Aktin gebildet werden. In der Zelle bildet Aktin dynamische Filamente, die sogenannten Aktinfilamente. Diese Filamente dienen als Bestandteil des Zytoskeletts der Stabilisierung der äußeren Zellform und dem intrazellulären Transport. Durch den Einsatz von Latrunculin A konnte gezeigt werden, dass die Aktinfilamente *in vivo* schnelle Zyklen von Assemblierung und Deassemblierung durchlaufen, was auf ein sehr dynamisches Zytoskelett selbst in einem nicht-beweglichen Organismus wie Hefe schließen lässt (Lombardi and Riezman, 2001).

Hefen, denen das „actin filament bundling protein Fimbrin“ fehlt (Sac6p), zeigen einen kompletten Block in der Endozytose des α - Faktors (Kubler and Riezman, 1993). Aktin-Bündlungsproteine wie Fimbrin sind für den Zusammenhalt von Aktin-Filamenten untereinander verantwortlich. Auch die Endozytose von K28 wurde in einer $\Delta sac6$ Mutante verhindert, sie verhielt sich gegen Toxin komplett resistent.

Verschiedene Proteine, die wichtig für die Organisation des Aktins in der Zelle sind, haben ebenfalls einen Einfluss auf die Endozytose und besitzen Homologe zu Proteinen in anderen Organismen, die für die Clathrin-abhängige Endozytose verantwortlich sind. Verschiedene Proteinkomplexe konnten identifiziert werden, deren Komponenten mit Aktin direkt oder indirekt über weitere Aktin-Bindeproteine assoziieren. Diese Abfolge von Ereignissen an der Plasmamembran erfolgt in mehreren Schritten.

An der Plasmamembranoberfläche befinden sich spezielle Regionen, an denen die Endozytose stattfindet. Clathrin und Ede1p sind die ersten Proteine, die an diesen speziellen Regionen die Endozytose einleiten (Newpher *et al.*, 2005). Clathrin ist dabei nicht essentiell für die Endozytose in Hefe, aber verantwortlich für die weitere korrekte Rekrutierung der späteren Endozytose-Proteine (Kaksonen *et al.*, 2006). Ede1p, ein Homolog zum Säuger-eigenen Eps15, besitzt drei N-terminale EH-Domänen und eine C-terminale UBA-Domäne. Eine EH-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne, die etwa 100 Aminosäuren lang ist und in der Evolution hochkonserviert vorliegt. Als optimaler Ligand dieser Domäne wurde das Tripeptid Asn-Pro-Phe (NPF) identifiziert, welches in mehreren an der Endozytose beteiligten Proteinen vorkommt (Gagny *et al.*, 2000). Die UBA-Domäne von Ede1p (ubiquitin associated) ist in der Lage, Ubiquitin direkt zu binden. Ede1p kann somit ubiquitinierte Membranrezeptoren binden, um weitere Endozytoseproteine zur Membran zu rekrutieren und mit diesen über die EH-Domänen eine Verbindung einzugehen. Gagny und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass die rezeptorvermittelte Endozytose in einem Δ *ede1* Stamm stark eingeschränkt ist. Gegenüber dem Wildtyp zeigte eine Δ *ede1* Deletionsmutante eine um 35% reduzierte Aufnahme des α -Faktors. Für K28 konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Ein Δ *ede1* Stamm zeigte eine zwar noch geringe Sensitivität gegen K28, jedoch war diese um etwa 90% gegenüber dem Wildtyp herabgesetzt. Einen weiteren Hinweis auf die Vernetzung zwischen dem Aktin Zytoskelett und der Ubiquitin-abhängigen Endozytose ergibt sich aus der Tatsache, dass eine *EDE1*-Deletion in einer *rsp5-1*-temperatursensitiven Mutante synthetisch letal ist

(Gagny *et al.*, 2000). Möglicherweise interagiert Ede1p mit Rsp5p oder ist für die korrekte Lokalisation von Rsp5p verantwortlich.

Weitere zytosolische Proteine werden für die ersten Schritte der Clathrin-abhängigen Endozytose gebraucht, darunter der Adapter-Protein-Komplex AP-2 und eine neue Klasse von Proteinen, die akzessorische Proteine genannt werden (Brodsky *et al.*, 2001; Kirchhausen, 2000). Dabei handelt es sich um die Epsine Ent1p und Ent2p sowie die Proteine YAP1801p und YAP1802p, die alle Clathrin- als auch $\text{PtIns}(4,5)P_2$ -Bindedomänen besitzen und deren Funktion darin besteht, Clathrin zu endozytotischen Aufnahmestellen zu leiten (Newpher *et al.*, 2005). Einzelmутanten der akzessorischen Mutanten wurden im Screen auf K28-Sensitivität getestet, zeigten aber keine Abweichungen in ihrem Phänotyp zum Wildtyp. Für die Epsine Ent1p und Ent2p ist bekannt, dass sie überlappende Funktionen erfüllen, weshalb eine Doppelmutante nicht lebensfähig ist (Wendland *et al.*, 1999). Um ihren Einfluss auf die Endozytose von K28 zu testen müssten deshalb temperatursensitive Mutanten zum Einsatz kommen. Gleiches gilt auch für die Proteine YAP1801/2p (Wendland and Emr, 1998).

Die Endozytose wird weiterhin eingeleitet, indem sich Membranrezeptoren zusammen mit ihrem gebundenen Liganden an den endozytotischen Aufnahmestellen sammeln, nachdem sich dort die Proteine der frühen Endozytose angelagert haben (Toshima *et al.*, 2006). Die Bindung des Liganden stimuliert die Phosphorylierung, die Ubiquitinierung und die Erkennung von NPFXD-Motiven als Internalisierungssignale (Hicke *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2002).

Ein bis zwei Minuten nachdem Clathrin an endozytotischen Aufnahmestellen erscheint, wird Las17p (Hefe-Homolog zu dem humanen Wiskott-Aldrich Syndrom Protein WASP) rekrutiert, welches wiederum den Arp2/3-Komplex aktiviert, der für die Aktin-Assemblierung verantwortlich ist (Kaksonen *et al.*, 2006). Eine Deletion des *LAS17*-Gens ist letal, weshalb dieses Protein im Screen nicht getestet werden konnte. Gleichzeitig mit der Rekrutierung von Las17p verschwindet Ede1p und weitere Hüllproteine wie Sla2p/End4p und der Pan1 Komplex akkumulieren (Kaksonen *et al.*, 2006). Der Einfluss von Sla2p auf die Aufnahme von K28 wurde bereits diskutiert. Der Pan1p

Komplex besteht aus den Proteinen End3p und Sla1p, wobei Sla1p als negativer Regulator von Las17p fungiert und den Cargo-Adapter für die NPFXD-vermittelte Endozytose darstellt (Howard *et al.*, 2002). Pan1p enthält ebenfalls eine EH-Domäne (Tang *et al.*, 1997; Wendland and Emr, 1998). Eine Deletion von *PAN1* ist letal. Eisfeld (2001) konnte bereits den Einfluss von *END3* und *END4/SLA2* auf die Endozytose von K28 nachweisen. Pan1p und End3p interagieren im Yeast-Two-Hybrid-System und ihre Komplexbildung konnte durch Koimmunpräzipitation verifiziert werden. Eine Δ end3-Deletion zusammen mit einer *pan1-4* Mutation ist ebenfalls letal (Tang *et al.*, 1997).

Als nächster Schritt wird die Aktin-Assemblierung eingeleitet. Verprolin (Vrp1p) stimuliert Myo5p, ein Typ I-Myosin-Motor-Protein, welches wiederum den Arp2/3 Komplex aktiviert, der die Aktin-Assemblierung für die Internalisierung vermittelt (Sun *et al.*, 2006). Das Typ I-Myosin ist verantwortlich für die Aktin-abhängigen Membranbewegungen (Mermall *et al.*, 1998). Das Hefegenom enthält zwei Gene für zwei Typ I Myosine, *MYO3* und *MYO5*. Im Gegensatz zu einem Δ myo3-Stamm, ist eine Δ myo5 Mutante nicht mehr in der Lage α -Faktor bei 37°C zu internalisieren, was auf eine direktere Rolle von Myo5p im Internalisierungsschritt schließen lässt (Geli and Riezman, 1996). Übereinstimmend mit diesen Literaturdaten konnte im Screen der Deletionsmutanten des zellulären Transports eine Δ myo3 Mutante als sensitiv gegen K28 getestet werden. Ein Δ myo5 Stamm verhielt sich aufgrund seines Einflusses auf die Endozytose des Toxins fünfmal sensitiver als der zugehörige Wildtyp. Die genaue Funktion von Myo5p im Internalisierungsschritt ist noch unbekannt. Da keines der in Hefe zu Dynamin homologen Proteine eine Rolle bei der Endozytose spielt, wird angenommen, dass Myo5p als Ersatz für Dynamin in Hefe wirkt (Geli and Riezman, 1996). Myo5p interagiert über seine SH3-Domäne mit End5p/Vrp1p und diese Interaktion wird gebraucht, um eine korrekte Lokalisation von Myo5p zu gewährleisten (Anderson *et al.*, 1998). Vrp1 konnte in einem Screen nach Endozytose-defekten Mutanten isoliert werden (Munn and Riezman, 1994) und zeigte auch gegen K28-Toxin eine komplette Resistenz. Vrp1p/ End5p interagiert mit Aktin im Two-Hybrid-System und

enthält eine Aktin-Bindedomäne innerhalb der ersten 70 Aminosäuren (Vaduva *et al.*, 1997). Der Arp2/3-Komplex konnte in mehreren Organismen identifiziert werden, wo er eine Rolle bei der Regulation des Aktin-Zytoskelets spielt. Er besteht aus sieben Untereinheiten, die die Zusammenlagerung der Aktin-Filamente stimulieren (Goley and Welch, 2006). Mutationen in den Genen *ARP2* (Moreau *et al.*, 1997) und *ARP3* (C. Schaerer-Brodbeck and H. Riezman, unveröffentlicht) blockieren die rezeptorvermittelte Endozytose. Deletionsmutanten dieser Gene sind letal und wurden nicht getestet.

Die Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Vesikelhülle wird wahrscheinlich über Sla2p hergestellt (Kaksonen *et al.*, 2006; Newpher and Lemmon, 2006).

Die Aktivität des Myosin-Motors und das assemblierende Aktin an der Plasmamembran führen zur Abschnürung des Vesikels (Sun *et al.*, 2006) und zur Rekrutierung der Amphiphysine Rvs161p und Rvs167p (Kaksonen *et al.*, 2006). Die Proteine Rvs167p und Rvs161p zeigen starke Sequenzhomologien untereinander und zum Säugerprotein Amphiphysin, welches in Säugerzellen mit Dynamin, Synaptojanin, dem AP2-Komplex und Clathrin interagiert (Sivadon *et al.*, 1995). Da Rvs161p und Rvs167p im Yeast-Two-Hybrid-System interagieren und Deletionen der Gene gleiche Phänotypen verursachen, wurde gefolgert, dass sie gemeinsame Aufgaben erfüllen (Navarro *et al.*, 1997). Die Proteine scheinen aber auch unabhängig voneinander zu funktionieren, da Rvs167p, im Gegensatz zu Rvs161p, eine Interaktion mit Aktin im Yeast-Two-Hybrid-System zeigt (Amberg *et al.*, 1995) und beide Proteine auch unterschiedlich in der Zelle lokalisiert sind (Balguerie *et al.*, 1999). Gleiche Funktion scheinen die Proteine allerdings bei der Endozytose des α -Faktors zu erfüllen, denn Mutationen beider Gene reduzieren die Endozytoserate um 50% (Munn, 2000). Die Endozytose des K28-Toxins scheint dagegen stärker von Rvs167p abhängig zu sein, da die Deletionsmutante $\Delta rvs167$ nur noch eine 30%ige, die $\Delta rvs161$ Mutante dagegen einen nahezu unveränderte Toxinaufnahme zeigte. Weitere Bestandteile dieses Komplexes sind die Proteine Pho85p, End4p, Abp1p, die alle mit Rvs167 interagieren. Pho85p ist eine Zyklin-abhängige Kinase. Die Ähnlichkeiten der Phänotypen bei der Deletion von *PHO85* und *RVS167* als

auch die reduzierte Phosphorylierung von Rvs167p in einem $\Delta pho85$ Stamm *in vivo* deuten auf eine regulatorische Funktion der Pho85p Kinase auf die Aktivität von Rvs167p (Lee *et al.*, 1998). Reiter (2004) konnte zeigen, dass die Deletion der Kinase Pho85p eine verminderte Sensitivität gegen K28-Toxin verursacht.

Nach der Abschnürung des Vesikels und nach ungefähr 200 nm Fortbewegung in der Zelle, findet die Rekrutierung von deassemblierenden Proteinen statt, die die Verbindung zu den Aktinkabeln und den Hüllproteinen lösen. Anschließend assoziiert das Vesikel mit Aktinkabeln innerhalb der Zelle (Huckaba *et al.*, 2004) und fusioniert schließlich mit Endosomen, wobei die für diese Mechanismen verantwortlichen Proteine noch nicht identifiziert werden konnten. Eine zusammenfassende Darstellung der Vorgänge an der Plasmamembran und bei der Vesikelbildung zeigt Abbildung 39.

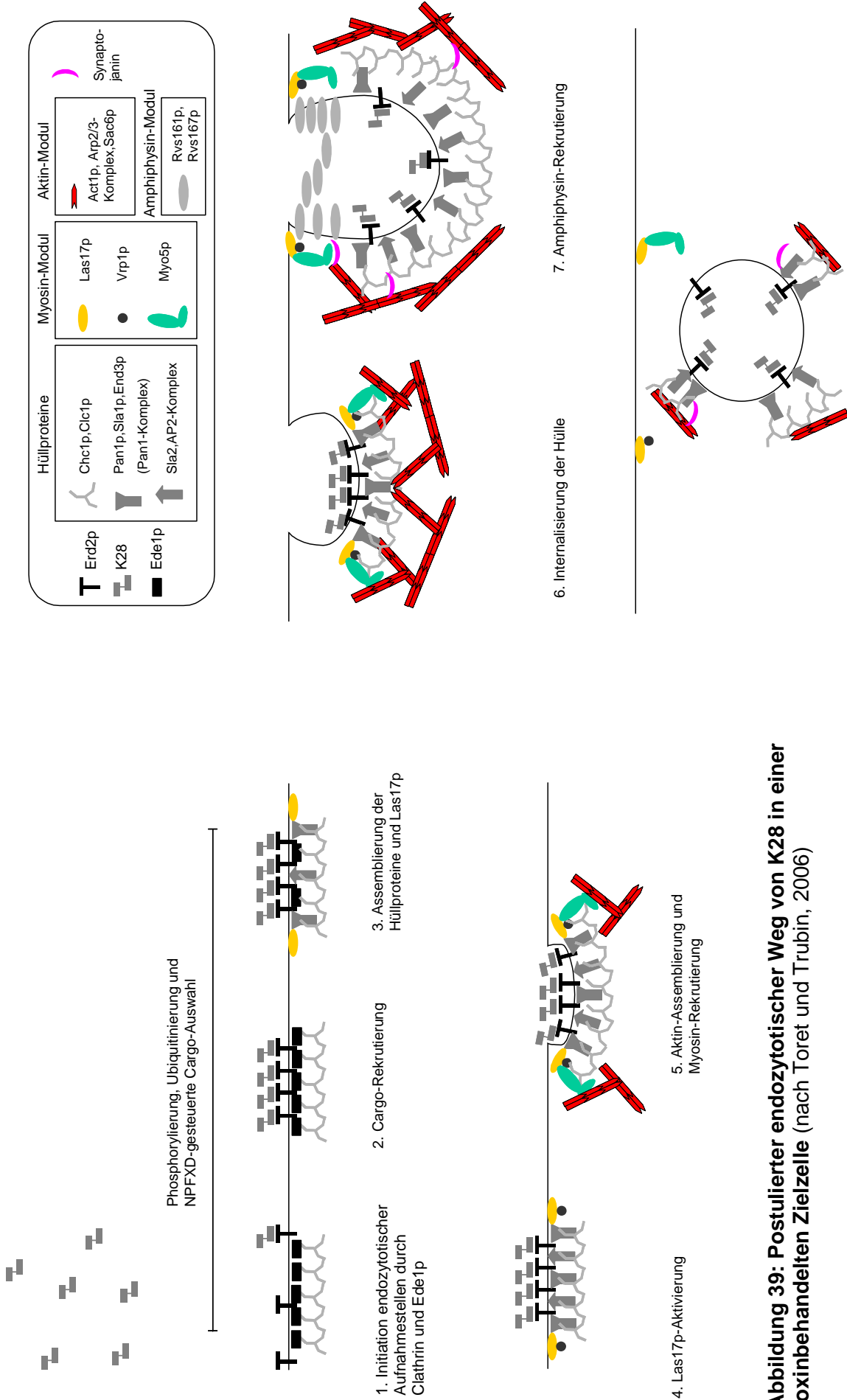


Abbildung 39: Postulierter endozytischer Weg von K28 in einer toxinbehandelten Zielzelle (nach Toret und Trubin, 2006)

4.1.6 Nur ein Teil des K28-Toxins gelangt über Endosomen zum Golgi

Die Testung von Hefedeletionsmutanten brachte Aufschluss über die Mechanismen der späten Endozytose, die bei der Toxinwirkung von K28 eine Rolle spielen. Im Screen zeigten die Proteine Vps27p und Vps2p/Did4p eine verminderte Sensitivität gegen K28. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Mitglieder des ESCRT-Komplexes, der an der Ausbildung von Vesikeln aus Endosomen beteiligt ist. Der Ubiquitin-abhängige Abbau der aktivierten Signalrezeptoren in der Vakuole setzt eine Sortierung der Rezeptoren in den Endosomen in bestimmte Arten von Vesikeln voraus. Das endosomale Kompartiment, das diese Vesikel aufnimmt, wird als MVB („multivesicular body“) oder prävakuoläres Kompartiment bezeichnet. Die Verschmelzung des MVB mit der vakuolären Membran führt die luminalen MVB-Vesikel und deren Inhalt dem Abbau in der Vakuole zu. Untersuchungen zeigten, dass auch hier Ubiquitin als ein Signal für die effiziente Sortierung in den MVB-Transportweg sorgt (Katzmann *et al.*, 2001). Vps27p und Vps2p gehören zu den Klasse E Vps-Proteinen. Mutanten dieser Klasse akkumulieren endosomale Membranen und zeigen Defekte in der Ausbildung von MVB-Vesikeln. Es konnten drei hochmolekulare, zytoplasmatische Proteinkomplexe charakterisiert werden, die bei der Sortierung zum prävakuolären Kompartiment für die Vesikelbildung verantwortlich sind und als ESCRT („Endosomal Sorting Complex Required for Transport“)-Komplex I, II, und III bezeichnet werden. Vps27p bildet mit Hse1p einen Komplex im Zytoplasma und bindet anschließend an monoubiquitinierte Substrate in der endosomalen Membran und rekrutiert ESCRT I (Vps23p, Vps28p, Vps37p), das ebenfalls mit Ubiquitin interagiert. Daraufhin erscheint ESCRT II (Vps22p, Vps25p, Vps36p), der wiederum ESCRT III (Vps20p-Snf7p, Vps2p/Did4p-Vps24p) rekrutiert, woraufhin die Vesikelbildung erfolgt. Da bekannt ist, dass das K28-Toxin retrograd über Golgi-Apparat und ER das Zytoplasma erreicht, stellt sich die Frage, auf welchem Wege es nach der Endozytose zum späten Golgi gelangt. In Hefe existieren zwei Möglichkeiten des Transports vom Endozytoseweg zum Golgi-System: zum einen über das „sorting“ von Proteinen im frühen Endosom, zum anderen

können Proteine (wie z.B. Kex2p und CPY) aus einem späten endosomalen/prävakuolären Kompartiment selektiv zum Golgi zurückgeleitet werden (Pelham, 2002). Eisfeld (2001) konnte eine Hypersensitivität von Ypt51p, einer GTPase der Rab-Familie, nachweisen und stellte deshalb die These auf, dass das Toxin direkt aus einem frühen Endosom zum trans-Golgi transportiert wird. Da allerdings die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen Einfluss des ESCRT-Komplexes am endozytotischen Weg des Toxins schließen lassen und auch der gestörte Abbau in der Vakuole zu einer stark erhöhten Toxinwirkung führt, ist davon auszugehen, dass das Toxin ein spätes Endosom durchläuft, um den Golgi zu erreichen. Da sich jedoch die getesteten Mutanten des ESCRT-Komplexes nicht komplett resistent verhielten, kann daraus geschlossen werden, dass das Toxin eventuell auch auf einem alternativen Weg, nämlich aus dem frühen Endosom, den Golgi erreicht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Eisfeld (2002), die zeigen, dass ein ausschließlicher Transport von K28-Toxin über das prävakuoläre Kompartiment ausgeschlossen werden kann, da sich Mutanten, die das „retrieval“ aus dem MVB in das Golgi System betreffen (wie *vps5*, *vps17*, *vps29*, *vps35* und *vps27*), sensitiv verhielten und nicht die zu fordernde Toxinresistenz zeigten.

Auch für das Pflanzentoxin Ricin, das ähnlich wie K28 retrograd in das Zytosol der Zielzelle transportiert wird, konnte gezeigt werden, dass nur eine kleine Fraktion der internalisierten Toxinmoleküle bis zum Golgi transportiert wird (Sandvig and van Deurs, 1996). Es wird vermutet, dass Ricin das Golgi System nicht oder nicht ausschließlich über das späte endosomale Kompartiment erreicht, sondern entweder sowohl über das frühe als auch das späte Endosom oder ausschließlich über das frühe Endosom (Sandvig and van Deurs, 2000). Für das B-Fragment des Shiga-Toxins konnte gezeigt werden, dass dieses direkt vom frühen Endosom in den Golgi Apparat transportiert wird, ohne das späte endosomale Kompartiment zu durchlaufen (Mallard *et al.*, 1998).

Die Frage, ob K28 in einem ersten Schritt endozytotisch in ein frühes oder spätes Endosom aufgenommen wird, kann hier allerdings nicht beantwortet werden. Einen weiteren Hinweis dafür, dass ein Großteil des K28-Toxins in

der Vakuole abgebaut wird und nur ein geringer Teil das Zytosol erreicht, liefern Ergebnisse, die eine Hypersensitivität bei Fehlen der Proteine Vps15p, Vps34p, Vps45, Pep7p/Vac1p, Pep3p und Pep5p zeigen. Die zwei *VPS*-Gene *VPS15* und *VPS34* kodieren für einen regulatorischen Komplex, der für die Sortierung von vakuolären Proteinen benötigt wird. Mutanten mit einer Deletion der Gene zeigen gleiche Phänotypen wie Defekte im Transport von mehreren löslichen vakuolären Hydrolasen, einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt und Defekte in der Osmoregulation (Herman *et al.*, 1992). Genetische, molekulare und biochemische Analysen konnten zeigen, dass die *VPS15* und *VPS34* Gene eine Serin/Threonin-Proteinkinase und eine Phosphatidylinositol-3-Kinase kodieren, die den vesikulären Transport vom Golgi zur Vakuole regulieren (Stack *et al.*, 1995). Das *VPS45* Gen der Hefe kodiert für ein Sec1p-ähnliches Protein und ist für die Verschmelzung von Golgi-Vesikeln mit dem MVB auf dem Weg zur Vakuole verantwortlich. Mutanten dieses Gens zeigen eine Akkumulation kleiner Vesikel und eine Sekretion der vakuolären Hydrolase Carboxypeptidase Y (Piper *et al.*, 1994). Pep7p/Vac1p ist ein peripheres Membranprotein, welches mit endosomalen Kompartimenten assoziiert. Pep7p/Vac1p bindet hauptsächlich an strukturelle und regulatorische Faktoren, die für die Bindung und Fusion von Vesikeln aus dem Golgi mit dem prevakuolären Kompartiment verantwortlich sind, darunter auch Vps45p (Peterson *et al.*, 1999). Die Proteine Pep3p und Pep5p bilden einen Komplex, der ebenfalls am endosomalen, vakuolären Transportweg beteiligt ist und mit SNARE-Komponenten interagiert, um die Bindungs- und Fusionsreaktionen zu vermitteln (Srivastava *et al.*, 2000). Mutanten der Gene *VPS7*, *PEP3* und *PEP5* zeigen alle verminderte Hydrolaseaktivitäten. Die Hypersensitivität dieser Mutanten kann durch zwei alternative Hypothesen erklärt werden. Zum einen kann angenommen werden, dass in diesen Mutanten die Hydrolasen, die für den Abbau des Toxin-Rezeptorkomplexes in der Vakuole benötigt werden, nicht mehr in die Vakuole gelangen und das Toxin deshalb effektiver in den reversen Sekretionsweg eingeschleust wird. Da es sich bei dem Transport der vakuolären Proteine aus dem Golgi zur Vakuole ebenfalls um einen rezeptorvermittelten Prozess handelt, wäre auch

vorstellbar, dass der Rezeptor-Toxin-Komplex aus dem Golgi über die Mechanismen der vakuolären Proteinsortierung zur Vakuole gelangt, um dort abgebaut zu werden.

Auch für andere Proteintoxine ist bekannt, dass ein Teil der aufgenommenen Toxine zu den Lysosomen geleitet wird, wo sie einem Abbau unterliegen (Sandvig and van Deurs, 2005). Das Pflanzentoxin Ricin wurde benutzt, um zu quantifizieren, wieviel des Toxins in unterschiedliche Kompartimente wie Golgi-Apparat oder Lysosom gelangt. Van Deurs und Mitarbeiter (1988) konnten zeigen, dass nach 60-minütiger Inkubation mit Ricin nur 4-6% des aufgenommenen Toxins den Golgi-Apparat erreichen, was ungefähr $6-8 \times 10^4$ Ricin-Molekülen entspricht. Dahingegen befanden sich zwischen 57-63% des Toxins in Endosomen und 33-35% in Lysosomen. Interessanterweise zeigte sich, dass multivalente Komplexe von Ricin und auch Ricin, welches an Goldpartikel gekoppelt war, direkt zu den Lysosomen geleitet wurden, wohingegen monovalentes Ricin auch zum Golgi-Apparat gelangte. Die Art des Toxin-Konjugates scheint deshalb den Transportweg und das letztliche Ziel innerhalb der Zelle festzulegen.

4.1.7 Ein Großteil des Toxins wird in der Vakuole abgebaut

Untersuchungen an einer Vielzahl von Plasmamembranproteinen zeigten, dass diese nach ihrer Liganden-stimulierten Endozytose internalisiert und zum frühen Endosom verbracht werden, wo sie in Vesikel verpackt und schließlich in der Vakuole abgebaut werden. Nachdem für K28 im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Toxin-Internalisierung fast identisch zu der von Plasmamembranproteinen verläuft, zeigte sich im Mutanten-Screening ebenfalls ein Einfluss der Vakuole auf die K28-Toxizität. Die Vakuole der Hefe stellt das Äquivalent zum Lysosom im Säuger und der pflanzlichen Vakuole dar. In Wildtyp-Zellen stellt sie bis zu 25% des zellulären Volumens. Die vakuoläre, Protonen-pumpende ATPase (V-ATPase) generiert und hält den azidischen pH von 6,2 dieses Kompartiments aufrecht. Als Hauptabbauort in der Zelle enthält die Vakuole eine Reihe kataboler Enzyme, darunter Endo- und Exoproteasen, Ribonukleasen, Polyphosphatasen, α -Mannosidasen, Trehalasen und alkaline

Phosphatasen. Die Vakuole ist Speicherstätte verschiedener zellulärer Nährstoffe wie Aminosäuren, Purine, Polyamine, S-Adenosinmethionin und Polyphosphaten. Die hefeeigene Vakuole dient ebenfalls als Reservoir für mono- und divalente Kationen. Durch die Möglichkeit der Vakuole, hohe Konzentrationen an Ionen abzufangen, erfüllt sie auch eine detoxifizierende Funktion (Preston *et al.*, 1989).

Die V-ATPase ist aus zwei Multiprotein-Komplexen aufgebaut: die V_0 -Untereinheit verankert die V-ATPase in der vakuolären Membran und die V_1 -Untereinheit stellt die katalytische Funktion. Die V_1 -Domäne assoziiert reversibel mit der vakuolären Membran und besteht aus acht Polypeptiden mit Größen von 69, 57, 54, 42, 32, 27, 14 und 13 kDa. Tfp1p (69 kDa) und Vma2p (60 kDa) sind für die katalytische Funktion verantwortlich. Ein Strukturmodell, erstellt auf der Basis der bovinen V-ATPase, besitzt jeweils drei Kopien von Tfp1p und Vma2p in der V_1 -Domäne (Abbildung 40). Bei den anderen Polypeptiden der V_1 -Untereinheit handelt es sich um Vma13p (54kDa), Vma5p (42 kDa), Vma8p (32 kDa), Vma4p (27kDa), Vma7p (14kDa) und Vma10p (13kDa). Die V_0 -Untereinheit ist aus den fünf Polypeptiden Vph1p (95 kDa), Vma6p (36 kDa), Vma16p (23 kDa), Vma3p (17 kDa) und Vma11 (17 kDa) aufgebaut (Forgac, 1999).

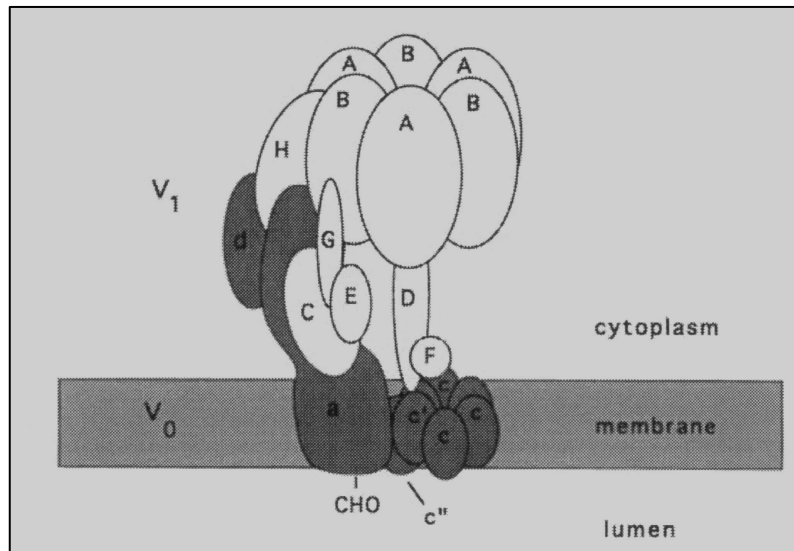


Abbildung 40: Aufbau der V-ATPase der Hefe (aus Forgac,1999)

V1-Sektor: Vma1p (A), Vma2p (B), Vma5p (C), Vma8p (D), Vma4p (E), Vma7p (F), Vma10p (G), Vma13p (H)

V0-Sektor: Vph1p/Stv1p (a), Vma6p (d), Vma3p (c), Vma11p (c'), Vma16p (c'')

Funktionsdefekte in der Vakuole manifestieren sich in der Mislokation von Proteinen, Störungen des Ionen-Gleichgewichts und haben Einfluss auf Osmoregulation und Sporulation (Kucharczyk and Rytka, 2001). Mutanten mit Defekten der V-ATPase wachsen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nur sehr langsam auf einem komplexen Medium und zeigen kein Wachstum auf Medium, das auf einen pH von 7,5 eingestellt ist (Yamashiro *et al.*, 1990). Nelson und Nelson (1990) stellten die These auf, dass in Abwesenheit der vakuolären ATPase-Aktivität die Fluid-phase-Endozytose ausreicht, um endozytotische Kompartimente anzusäuern, wenn das externe Medium einen sauren pH zwischen 5 und 6 aufweist. Mutationen, die in Defekten der Endozytose resultieren, zeigen sich deshalb in Kombination mit Defekten der vakuolären Azidifikation letal (Munn and Riezman, 1994).

Hefen mit Deletionen in den Genen der V-ATPase zeigten gegen K28-Toxin im Minimal-MBA einen hypersensitiven Phänotyp im Vergleich zum Wildtypstamm BY4742. Mutationen in der integralen Membrandomäne V_0 hatten einen stärkeren Einfluss als Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne V_1 . Die Hefedeletionsmutanten $\Delta vma11/16$ und $\Delta vma6$ zeigten um das 13 bzw. 19-fache gesteigerte Sensitivitäten, bei denen es sich um die stärksten im Screen identifizierten Hypersensitivitäten handelte. Disruptionen der Gene, die für die Untereinheiten der V-ATPase kodieren, verursachen gleiche Phänotypen, mit Ausnahme der Gene *VPH1* und *STV1*, deren Genprodukte Polypeptide der V_0 -Untereinheit sind. Knock-out-Mutanten der Gene *vph1* weisen nur geringe Effekte auf, während $\Delta stv1$ Mutanten gar keine Veränderungen ihres Phänotyps zeigen (Manolson *et al.*, 1994). Für den Phänotyp gegen K28-Toxin konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden. Gegenüber dem Wildtyp zeigte eine $\Delta stv1$ Mutante gleiche und eine $\Delta vph1$ Mutante nur eine um das 2,5-fache gesteigerte Sensitivität.

Die vakuoläre H^+ -ATPase generiert die Energie und den dazugehörigen pH-Wert in verschiedenen Kompartimenten des vakuolären Systems der Zelle (Nelson and Harvey, 1999). Sie ist in den Organellen des Sekretionswegs vorhanden und spielt bei dessen Funktion, vor allem im Golgi-Komplex eine zentrale Rolle (Grunow *et al.*, 1999; Moriyama and Nelson, 1989;

Schoonderwoert *et al.*, 2000; Ying *et al.*, 2000). Der pH-Wert des sekretorischen Weges fällt vom ER zum Golgi hin ab und erreicht sein Maximum an Azidität in den Lysosomen. Im Golgi-Komplex ist der am stärksten azidische Teil der trans-Golgi, da hier auch die Menge an V-ATPase am größten ist. Das Verhältnis zwischen V-ATPase-Funktion und dem endozytotischen Prozess ist verblüffend, da einerseits die Endozytose für die Lebensfähigkeit der V-ATPase-Nullmutanten verantwortlich ist, andererseits einige Endozytose-Mutanten einen sehr ähnlichen Phänotyp wie V-ATPase-Nullmutanten aufweisen (D'Hondt *et al.*, 2000; Munn and Riezman, 1994). Die Ansäuerung endosomaler Kompartimente durch die Aktivität der V-ATPase und die dadurch stattfindende Dissoziation des Liganden-Rezeptor-Komplexes in der rezeptorvermittelten Endozytose ist im Säugersystem gut untersucht (Mellman *et al.*, 1986). In Hefe muss dieser Zusammenhang noch gezeigt werden. Perzov und Mitarbeiter (2002) konnten nachweisen, dass der fluoreszierende Endozytosemarker FM 4-64 (Vida and Emr, 1995) in V-ATPase-Nullmutanten nur unzureichend in die Zelle aufgenommen wird. Nach 60 Minuten zeigte sich in den Wiltyp-Zellen eine Konzentration des Farbstoffes in der vakuolären Membran, wohingegen in den Mutanten der Farbstoff nur in Endosomen nachzuweisen war und die Vakuole nicht erreichte. Für das K28-Toxin kann postuliert werden, dass der Komplex aus Membranrezeptor und K28 in den V-ATPase Nullmutanten ebenfalls nicht mehr die Vakuole erreichen kann. Das Toxin zeigt dadurch eine stärkere Toxizität, indem es effektiver in den retrograden Sekretionsweg eingeschleust wird und nicht teilweise dem Abbau in der Vakuole unterliegt.

4.1.8 Die Doa4p Ubiquitin Isopeptidase deubiquitiniert den K28-Membranrezeptor

Wie bereits vorher dargestellt, kann davon ausgegangen werden, dass der Membranrezeptor des Toxins nach der Bindung von K28 vor der Internalisierung durch die Enzyme Ubc4p und Rsp5p ubiquitiniert wird. Die meisten ubiquitinierten Membranproteine werden endozytotisch aufgenommen und dann zum Abbau in die Vakuole transportiert. Da eine konstante Ubiquitin-Konzentration wichtig für die Erhaltung der Zellfunktionen

ist, werden ubiquitinierte Membranproteine vor ihrem Abbau in der Vakuole deubiquitiniert. In Hefe existieren 17 deubiquitinierende Enzyme (Dubs), wobei das Doa4-Enzym das am besten untersuchte ist und eine Rolle bei der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse und Ubiquitin-Homöostase spielt (Papa and Hochstrasser, 1993; Singer *et al.*, 1996; Swaminathan *et al.*, 1999).

Zellen, denen Doa4p fehlt, zeigen einen signifikanten Mangel an freiem Ubiquitin in der Zelle (Swaminathan *et al.*, 1999). Für die Uracil-Permease konnte gezeigt werden, dass diese vor dem Abbau in der Vakuole eine Deubiquitinierung durch Doa4p erfährt (Dupre and Haguenaer-Tsapis, 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit getestete $\Delta doa4$ Mutante zeigte im Agardiffusionstest eine komplette Resistenz gegen K28 im Gegensatz zum Doa4 Wildtyp, was auf einen Einfluss von Doa4p auf den Deubiquitinierungsschritt im Wirkungsmechanismus von K28 schließen lässt.

4.1.9 Eine Monoubiquitinierung des K28-Membranrezeptors reicht für die Endozytose aus

Da Doa4p sowohl an der Deubiquitinierung von Substraten des Proteasoms als auch von Plasmamembranproteinen auf dem Weg zur Vakuole beteiligt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, an welchem Schritt Doa4p beim Wirkungsmechanismus von K28-Toxin beteiligt ist. Das Proteasom baut vorzugsweise polyubiquitinierte Substrate ab (Kette aus mindestens vier Ubiquitin Molekülen), bei denen der Carboxy-Terminus eines Ubiquitins mit dem Lys48 des vorhergehenden Ubiquitins verknüpft ist. Die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen erfolgt über Monoubiquitin oder kurze Ubiquitin-Ketten. Diese sind, anders als der Typ von Ubiquitin-Kette, der vom Proteasom erkannt wird, über Lys63 miteinander verbunden (Dupre and Haguenaer-Tsapis, 2001). Um zu überprüfen, welcher Typ von Ubiquitin-Verknüpfung am Wirkungsmechanismus des K28-Toxins eine Rolle spielt, wurden Ubiquitin-Varianten, in denen die Lysin-Reste 48 und 63 gegen Arginin ausgetauscht wurden, in einer $\Delta doa4$ Mutante überexprimiert, die nur einen reduzierten Anteil an freiem, intrazellulärem Ubiquitin aufweist. Diese

Ubiquitin-Varianten wurden statistisch gesehen öfter in Ubiquitin-Konjugate eingebaut und die Elongation der Ubiquitin-Ketten an den Positionen 48 und 63 wurde weitgehend verhindert. Sowohl die Überexpression von UbK48R, als auch die von UbK48R/K63R in einer $\Delta doa4$ Mutante führte zu einer wiederhergestellten Sensitivität der Mutanten gegen K28-Toxin. Dies bedeutet, dass eine Verknüpfung der Ubiquitinkette über Lysin 48 keinen Einfluss auf die Wirkung des Toxins besitzt und so auch nicht abhängig vom Abbau am Proteasom ist. Da neben der Verknüpfung über den Lysinrest 48 auch die Verknüpfung über den Lysinrest 63 keinen Einfluss auf K28 besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass eine Monoubiquitinierung oder eine kurze Ubiquitinkette über Lys63 für die Wirksamkeit von K28 ausreicht. Die Art der Ubiquitin-Verknüpfung konnte auch für Fur4p und Gap1p gezeigt werden. Beide Transporter besitzen zwei Lysinreste, die jeweils kurze Ketten aus bis zu zwei Ubiquitin-Molekülen (bzw. drei für Gap1p), verbunden über Lys63, akzeptieren können. Für beide Transporter gilt, dass jeweils ein Ubiquitinrest an den beiden Lysinresten ausreicht, um eine Endozytose auszulösen, aber eine kurze Ubiquitinkette, verbunden über Lys63, benötigt wird, um eine maximale Endozytoserate zu erreichen (Galan and Hagenauer-Tsapis, 1997; Springael *et al.*, 1999).

4.2 Der retrograde Toxintransport

Sekretorische Proteine und Transmembranproteine treten über den Sec61-Kanal in der Membran des endoplasmatischen Retikulums in den sekretorischen Weg ein. Im ER werden Proteine gefaltet, kovalent modifiziert und oligomerisiert, bevor sie in Transportvesikel verpackt und zum Golgi geleitet werden. Fehlgefaltete Proteine gelangen selektiv über die ER-Membran ins Zytosol zurück, um am Proteasom abgebaut zu werden. In Abhängigkeit des Proteindefektes sind lumenale oder zytosolische Chaperone am Transport zum Proteasom beteiligt. Der Exportkanal für fehlgefaltete Proteine besteht ebenfalls aus Sec61p als zentralem Element. Die Energie für den Export wird wahrscheinlich durch die AAA-ATPase der 19S-Untereinheit des Proteasoms oder von Cdc48p/p97 generiert. Die exportierten Proteine werden vor dem Abbau ubiquitiniert und durch Ubiquitin-bindende Proteine zum Proteasom eskortiert (Römisch, 2005).

Bakterielle und pflanzliche Toxine wie das Cholera-Toxin, das Shiga-Toxin, das *Pseudomonas* Exotoxin A und Ricin gelangen von der Zelloberfläche zum ER, um den Mechanismus der Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine auszunutzen und das Zytosol zu erreichen (Spooner *et al.*, 2006). Warum Toxine diesen erschwerten Weg des retrograden Transports durch die Zelle nutzen, kann durch mehrere Punkte begründet sein. Einige Toxine werden erst bei ihrem Weg durch die Zelle durch zelluläre Proteasen aktiviert und erreichen so ihre Toxizität. Die ER-Membran weist außerdem einen geringeren Cholesterolgehalt als die Plasmamembran auf und ist deshalb möglicherweise permeabler als Plasmamembran oder endosomale Membran, was vor allem für Moleküle mit Zuckerresten von Bedeutung sein könnte. Am wichtigsten erscheint allerdings die Tatsache, dass im ER Chaperone und Translokatoren vorhanden sind, die den ER-Zytosol-Übertritt vermitteln (Sandvig and van Deurs, 2005).

4.2.1 DnaJ Chaperone sind essentiell für den ER-Export von K28

Nishikawa und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass zwei verschiedene J-Domänen enthaltende ER-Proteine den Export von ERAD ("ER-associated degradation") Substraten vermitteln. Deletionen in Genen der Chaperone Jem1p und Scj1p, führten zur Stabilisation und Aggregation des mutierten pro- α -Faktors. ER lumenale Chaperone sind notwendig, um Substrate dem ERAD-Weg zuzuführen. Hefemutanten der Proteine Calnexin, Kar2p und dessen Partnerproteinen Scj1p und Jem1p verhindern die Degradation verschiedener löslicher Proteine (Brodsky *et al.*, 1999; McCracken and Brodsky, 1996; Nishikawa *et al.*, 2001; Plemper *et al.*, 1997). Für das Hsp70 Chaperon Kar2p/BiP konnte bereits die Notwendigkeit für die korrekte Zielsteuerung des K28-Toxins zum Sec61-Translokon nachgewiesen werden (Eisfeld, 2001; Eisfeld *et al.*, 2000). DnaJ-ähnliche Proteine regulieren den ATP-abhängigen Reaktionszyklus von Hsp70 Chaperonen, indem sie mit ihnen über ihre konservierte DnaJ-Domäne interagieren (Kelley, 1998). Das ER der Hefe enthält drei DnaJ-ähnliche Proteine: Sec63p, Jem1p und Scj1p (Nishikawa and Endo, 1997; Sadler *et al.*, 1989; Schlenstedt *et al.*, 1995). Sec63p ist ein essenzielles Membranprotein und interagiert mit BiP. Eisfeld konnte in Zusammenarbeit mit Wolf und Mitarbeitern beweisen, dass auch dieses Hsp40 Chaperon an der Translokation des Toxins beteiligt ist (Eisfeld, 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einen Einfluss der DnaJ-ähnlichen Proteine Jem1p und Scj1p auf die Translokation von K28 nachweisen. Wie die mutierte Carboxypeptidase Y (CPY*) und p α F (Nishikawa *et al.*, 2001) zeigte auch das K28-Toxin in einem $\Delta jem1 \Delta scj1$ -Stamm eine Stabilisierung im ER und verlor deshalb in diesem Stammhintergrund seine Toxizität.

Da K28 im ER Lumen wahrscheinlich ein falsch gefaltetes Protein vortäuscht und so den Translokationsmechanismus ausnutzt, um ins Zytosol zu gelangen, kann angenommen werden, dass die Hsp40 Chaperone mit BiP interagieren und der Aggregation von K28 entgegenwirken, um es in einer translokationskompetenten Form zu halten (Nishikawa *et al.*, 2001).

4.2.2 Änderungen der Ca^{2+} -Homöostase im Sekretionsweg verhindern die Ausbildung der K28-Toxizität

Ein wichtiger Punkt für die Toxizität von K28 ist die Ca^{2+} -Konzentration im Sekretionsweg der Hefe. Eine Mutante mit einem Defekt in der ATPase Pmr1p zeigte sich toxinresistent und nicht mehr in der Lage, das Toxin aus dem ER ins Zytosol zu entlassen. Die Sensitivität dieser Mutante konnte durch die Zugabe von bis zu 40 mM Ca^{2+} vollständig wiederhergestellt werden. Die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Pumpe, die im medialen Golgi ansässig ist, ist für die Erhaltung der Ca^{2+} -Konzentration im Sekretionsweg zuständig (Strayle *et al.*, 1999). Lumenale Ca^{2+} -Konzentrationen im ER sind für die Retention von residenten, lumenalen Proteinen (Booth and Koch, 1989), die Proteinfaltung (Lodish and Kong, 1990) und den Proteinabbau wichtig (Wileman *et al.*, 1991). Eine Deletion von *PMR1* führt zur Stabilisierung von CPY* und konnte somit auch als Komponente des ERAD identifiziert werden (Durr *et al.*, 1998). Eine Mutante mit einer Deletion des *COD1*-Gens, das für eine strukturell ähnliche P-Typ ATPase ansässig im ER kodiert, zeigte in der Sensitivität gegen K28 nur geringfügige Abweichungen zum Wildtyp. Für Cod1p ist bis jetzt noch kein direkter Transport von Calcium-Ionen nachgewiesen worden. Die ATPase-Aktivität von Cod1p wird durch Magnesium aktiviert, allerdings zeigen beide Deletionen von *PMR1* und *COD1* einen Anstieg in zellulärem Calcium (Cronin *et al.*, 2002; Durr *et al.*, 1998). Obwohl viele Chaperone im ER Calcium-abhängig operieren, beeinflusst die Deletion von *PMR1* und *COD1* den ERAD-Weg nicht generell. So zeigt sich der Abbau von Ste6-166p und Hmg2p in diesen Mutanten unbeeinflusst (Cronin *et al.*, 2002; Vashist *et al.*, 2002), der Abbau von CPY* im Gegensatz dazu, in Einzelmutanten verzögert, in einer $\Delta pmr1\Delta cod1$ -Doppelmutante sogar blockiert (Vashist *et al.*, 2002). Erklärt wird dieser Effekt durch die Unfähigkeit der Spaltung von N-Glykosiden von Man9 zu Man8 der $\Delta pmr1\Delta cod1$ -Doppelmutante. Dadurch soll der Abbau des Glykoproteins CPY* betroffen sein und die nicht glykosylierten Proteine Ste6-166p und Hmg2p weiterhin abgebaut werden können (Vashist *et al.*, 2002). Ob das K28-Toxin bei seinem retrograden Transport durch die Zelle oder im Verlauf des ERAD-Weges eine Glykosylierung erfährt, ist nicht bekannt. Da

sich die Einzelmutanten der P-Typ ATPasen jedoch völlig unterschiedlich hinsichtlich ihrer Sensitivität gegen K28-Toxin verhalten, ist davon auszugehen, dass die Glykosylierung im Wirkungsmechanismus von K28 keine Rolle spielt.

4.2.3 Die Protein-Disulfid-Isomerase sorgt für die ER-Retrotranslokations-Kompetenz des Toxins

Eine weitere wichtige Komponente im Lumen des ER, die fehlgefaltete Proteine erkennt und zum Translokon steuert, ist die Protein-Disulfid-Isomerase PDI. Dabei ist die Isomerase-Funktion der PDI verantwortlich für den Export von ERAD-Substraten mit Disulfidbrücken (Römisch, 2005). Experimente mit chemischen Reduktanten und Oxidanten zeigten, dass die Disulfidbrücken reduziert werden müssen, bevor eine Translokation über die ER-Membran stattfinden kann (Fagioli *et al.*, 2001; Gillece *et al.*, 1999; Tortorella *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PDI als Teil der Qualitätskontrolle fehlgefalteter Proteine im ER an der Toxizität von K28 beteiligt ist. Der toxinresistente Phänotyp einer $\Delta pdi 1$ Mutante und die Wiederherstellung ihrer Sensitivität gegen K28 durch plasmidgetriebene Expression von Wildtyp Pdi1p belegen dies. Des Weiteren konnte in GST-Pulldown Experimenten eine direkte Interaktion des K28-Toxins mit PDI nachgewiesen werden (Heiligenstein *et al.*, 2006). Die leichte Hypersensitivität einer $\Delta pdi 1$ Mutanten bei Rücktransformation mit einem *PDI1*-tragenden Plasmid wird vermutlich durch das Fehlen von PDI-ähnlichen Proteinen in der $\Delta pdi 1$ Mutante ausgelöst. Für Cholera-Toxin ist bekannt, dass dessen Retrotranslokation durch PDI unterstützt wird, wohingegen die PDI-ähnlichen Proteine eher für die Retention des Toxins im ER sorgen (Forster *et al.*, 2006). Für K28 könnte dies bedeuten, dass bei einem Ausschalten der PDI-ähnlichen Proteine effektiver Toxin ins Zytosol gelangt, um dort seine toxische Wirkung zu entfalten. Beim Proteinimport in das ER durch das Sec61-Translokon müssen die Proteine vollständig entfaltet sein. Die Rolle der Protein-Entfaltung während der Retrotranslokation wird noch diskutiert (Römisch, 2005). Im Zytosol von K28-

behandelten Zellen ist das Toxin als Heterodimer im Zytosol detektierbar, was auf eine Stabilität der Disulfidbrücke zwischen beiden Toxinuntereinheiten in der reduzierenden Umgebung des Zytosols hinweist. Gleiches gilt für die humane Superoxid-Dismutase, die ebenfalls fähig ist, intermolekulare Disulfidbrücken im Zytosol aufrecht zu erhalten (Lindberg *et al.*, 2004). Im Falle von K28 bedeutet dies aber auch, dass das Toxin in der Lage sein muss, im heterodimeren und gefalteten Zustand die ER-Membran zu passieren, da zytosolische Chaperone keinen Einfluss auf die Toxizität von K28 haben, d.h. nicht für eine eventuelle Neufaltung des Toxins im Zytosol zuständig sind. Dass die Entfaltung eines Proteins keine Voraussetzung für die ER-Dislokation ist, zeigen auch Untersuchungen an Proteinchimeren mit dem N-Terminus der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, GFP-HC und DHFR-HC (Tirosh *et al.*, 2003; Zietkiewicz *et al.*, 2004). Unter den AB-Toxinen ist K28 das einzige Beispiel für ein Proteintoxin, welches als Heterodimer das ER verlassen kann. Für die A-Untereinheit des Cholera-Toxins konnten Tsai und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass PDI die A-Kette entfaltet und so einen Übertritt aus dem ER in das Zytosol ermöglicht. PDI wirkt dabei als ein Redox-abhängiges Chaperon, welches in seinem reduzierten Zustand das A-Fragment bindet, es durch Überführung in seinen oxidierten Zustand freigibt und durch den Sec61-Kanal schleust. Eine Entfaltung der Ricin A-Kette wird ebenfalls benötigt, um eine ER-Retrotranslokation zu gewährleisten, da eine eingeführte Disulfidbrücke in RTA zu einer Inhibierung der *in-vivo*-Toxizität führt (Wesche *et al.*, 1999).

Die Protein-Disulfid-Isomerase ist ein Multidomänen-Protein, das aus den vier strukturellen Domänen a, b, b' und a' aufgebaut ist, denen eine Reihe von azidischen Resten am C-Terminus folgt (Domäne c) (Xiao *et al.*, 2001). Die a und a' Domänen zeigen 47%-ige gegenseitige Homologie und 27%-ige Homologie zu Thioredoxin. Beide Domänen enthalten ein aktives Zentrum mit dem Motiv CGHC und tragen zur Aktivität der PDI bei, obwohl sie in ihrer katalytischen Funktion nicht äquivalent sind (Vuori *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996). Die Peptidbindung wird durch die b'-Domäne der PDI vermittelt, was auf eine allgemeine Polypeptid-Bindungsstelle in diesem Bereich schließen

lässt (Pirneskoski *et al.*, 2001). Bei größeren Protein-Substraten (von mehr als 10-15 Aminosäureresten) werden aber auch die weiteren PDI-Domänen für eine Bindung benötigt (Klappa *et al.*, 1998).

Untersuchungen von Freedman und Mitarbeitern (1994) zeigen, dass die PDI zwei unterschiedliche Funktionen erfüllen kann. Zum einen katalysiert sie die Formation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfid-Brücken, zum anderen besitzt sie die Fähigkeit, Polypeptidketten zu binden. Letztere ermöglicht es der PDI, als molekulares Chaperon bei der Faltung von Polypeptiden zu assistieren.

Gegen die Redox-abhängige Chaperon-Funktion von Pdi1p auf die Toxinwirkung von K28 sprechen die Ergebnisse, die die Sensitivität einer $\Delta ero1$ Mutante gegen K28-Toxin zeigen. Eine funktionelle Ero1p-Oxidase wird benötigt, um die Oxidation der reduzierten PDI zu gewährleisten, die dann wiederum in der Lage ist, das entfaltete Toxin freizusetzen, wie es beim Cholera-Toxin der Fall ist (Tsai *et al.*, 2002).

Um die Wirkung der PDI auf K28 genauer zu untersuchen, wurden Pdi1p-Varianten getestet, die Mutationen im aktiven Zentrum der α - und α' -Domänen besaßen. In den katalytisch aktiven Zentren Cys-Gly-His-Cys, die beide an der Formation von Disulfid-Brücken beteiligt sind, sind nur die ersten beiden Cystein-Reste essentiell für die Isomerase-Funktion der PDI (Holst *et al.*, 1997; Solovyov *et al.*, 2004). Beide Mutanten waren in der Lage, die Sensitivität einer $\Delta pdi1$ Mutante wiederherzustellen. Allgemein wurde angenommen, dass die Bindung der PDI auch hierbei durch das Redox-Potential gesteuert wird und die Assoziation von Polypeptid und PDI, die Gegenwart von Glutathion und die Dissoziation die Gegenwart von Glutathion-Disulfid benötigt. Neuere Untersuchungen von Lumb und Mitarbeitern (2002) zeigen, dass die Bindung der PDI an ein Polypeptid nicht durch das Redox-Potential reguliert wird, sondern dass die Dissoziation der PDI von ihrem Substrat vielmehr durch die Konkurrenz zwischen Glutathion-Disulfid und der Polypeptidkette entsteht. Diese These kann durch Untersuchungen von Reiter *et al.* (2005) gestützt werden, die nachweisen, dass eine $\Delta gsh1$ Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, Glutathion zu synthetisieren, eine leichte Hypersensitivität zeigte, da hier keine Konkurrenz

zwischen Glutathion und dem K28-Toxin um die Bindungsstelle in der PDI stattfindet und die Translokation des Toxins aus dem ER ins Zytosol ungehindert erfolgen kann. Umgekehrt zeigte eine erhöhte Konzentration an Glutathion im Medium eine Schutzwirkung gegen K28-Toxin, da hier die Polypeptid-Bindungsstelle der PDI durch Glutathion besetzt ist und für das K28-Toxin nicht zugänglich ist.

Eine Isomerisierung der Disulfidbrücke in K28 durch die PDI ist durchaus vorstellbar. Die Präprosequenz von K28 enthält einen Cysteinrest in der α -Untereinheit an Position 56 und vier Cysteinreste in der β -Untereinheit an den Positionen 292, 307, 333 und 340. Riffer und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass die Disulfidbrücke des K28-Toxins zwischen den Cysteinresten 56 in der α -Untereinheit und 340 in der β -Untereinheit ausgebildet sein muss, um einen Wildtyp-Killer-Phänotyp zu verursachen. Ein Toxinderivat mit einer Mutation des Cys³⁴⁰ in Ser³⁴⁰ führte zwar zur Sekretion eines α/β heterodimeren Toxins, allerdings zeigte die betreffende Variante keine biologische Aktivität. Wie das Wildtyp-Toxin dissoziierte auch die C^{340S}-Variante unter reduzierenden Bedingungen in die beiden Untereinheiten α und β , was bedeutet, dass im mutierten Toxin eine alternative Disulfidbrücke aufgebaut wurde. Zellfraktionierungsexperimente zeigten, dass das mutierte Toxin nur in der Membranfraktion einer sensitiven Zelle nachweisbar war. Die biologische Inaktivität des Toxins ist aufgrund der falsch ausgebildeten Disulfidbrücke durch die Maskierung des HDEL-Signals am β -C-Terminus zu erklären, wodurch das Toxin nicht mehr in eine sensitive Zelle eindringen kann (Riffer *et al.*, 2002). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Toxin-Variante um die Form des Toxins, die durch die Isomerase-Funktion der PDI im ER gebildet wird und die schließlich in der Lage ist, das Zytosol zu erreichen.

4.2.4 Lysin-freies Toxin transloziert aus dem ER und ist toxisch

Der Export von K28 vom ER in das Zytosol einer sensitiven Zielzelle erfolgt über das Sec61 Translokon. Sec61 Mutanten, die einen Defekt ausschließlich in der Dislokation falsch gefalteter Proteine zeigen, verhielten sich sensitiv gegen K28-Toxin (Eisfeld, 2001; Eisfeld *et al.*, 2000).

Der Sec61-Komplex setzt sich aus dem trimeren Sec61-Komplex und dem tetrameren Sec62/63-Subkomplex zusammen. Letzterer besteht aus den Proteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p (homolog Sec66p) sowie Sec72p (Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995; Wittke *et al.*, 1999). Während der Sec61-Komplex die Pore in der Membran bildet, übernimmt der Sec62/63-Subkomplex zusätzliche Funktionen, die für den posttranslationalen Proteinimport in das ER-Lumen benötigt werden. Wie bereits erwähnt, konnte eine Wirkung von Sec63p auf die Toxizität von K28 gezeigt werden (Eisfeld, 2001). Mit Ausnahme von Sec63p selber, wies bis jetzt noch keine Komponente des Sec63-Komplexes einen Einfluss auf die Translokation fehlgefalteter Proteine aus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch die verminderte Sensitivität einer $\Delta sec66$ (*sec71*) Mutante die Notwendigkeit einer weiteren Komponente des Sec63-Komplexes auf die Retrotranslokation des Toxins festgestellt werden. Jedoch bleibt zu klären, ob der Effekt einer $\Delta sec71$ Mutante auf die Toxizität von K28 direkt oder indirekt ist. Null-Mutanten von *SEC71* zeigen eine Akkumulation von unprozessierten Vorläufer-Proteinen von Suc2p und Kar2p (Fang and Green, 1994). Möglicherweise führt dies dazu, dass das K28-Toxin aufgrund des geringeren Gehalts der Zelle an aktivem Kar2p nicht effektiv das Sec61-Translokon erreichen kann. Brizio und Mitarbeiter (1999) konnten einen Chaperonen-Komplex aus Kar2p, Kar5p und Jem1p beschreiben, der bei der Kernfusion in der Hefe eine Rolle spielt. Dieser Komplex wird durch die Proteine Sec71p, Sec72p und Sec63p stabilisiert. Möglicherweise hat die Interaktion der Chaperone Kar2p und Jem1p mit dem Sec62/63-Subkomplex einen direkten Einfluss auf die Retrotranslokation des K28-Toxins.

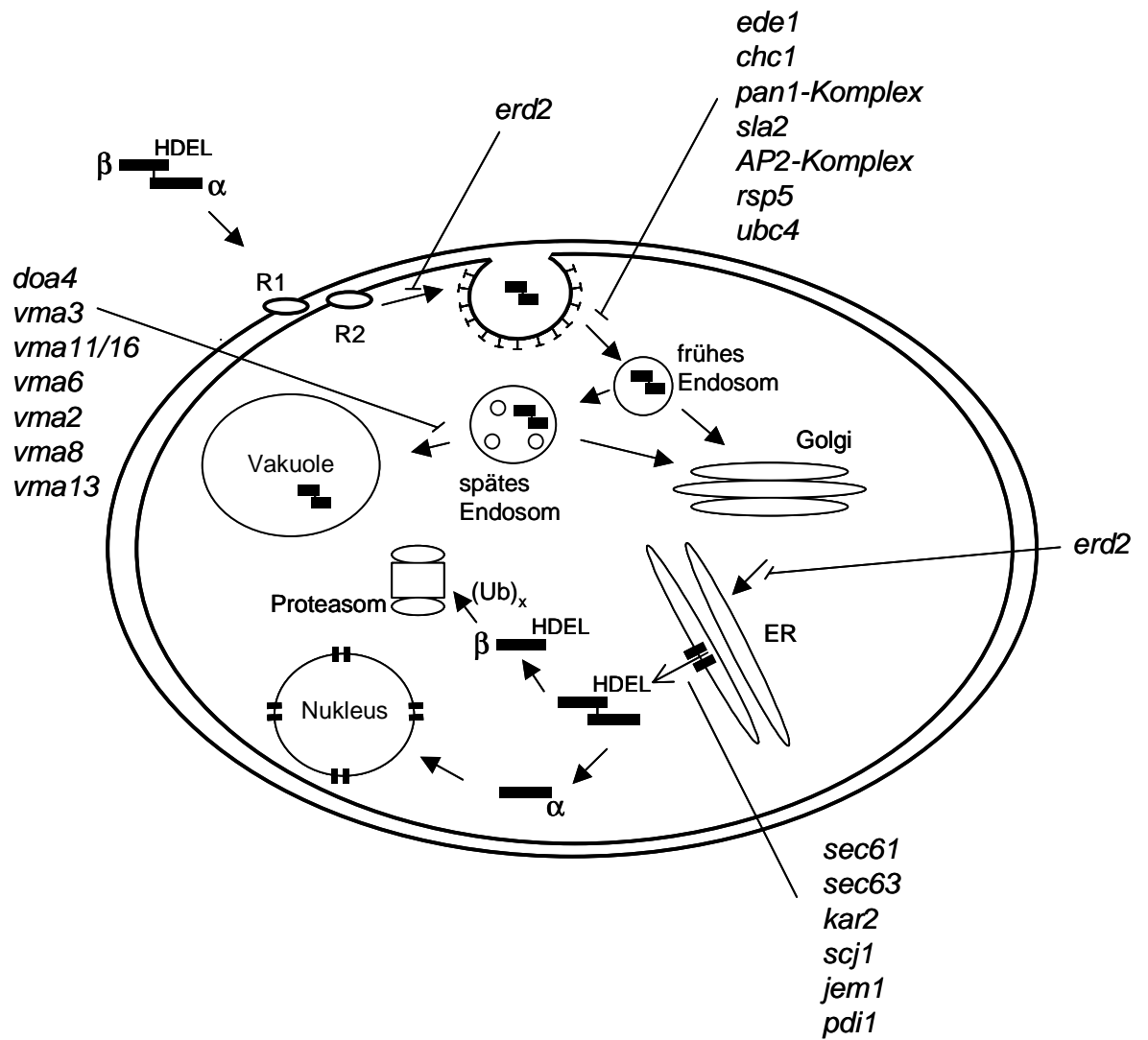
Viele ERAD-Substrate erfahren während ihres Exports aus dem ER eine Polyubiquitinierung. Das Ubiquitin ist dabei nicht nur als Signal für den Abbau am Proteasom zu sehen, sondern auch für die Retrotranslokation einiger Proteine verantwortlich (Biederer *et al.*, 1997; Bordallo *et al.*, 1998; de Virgilio *et al.*, 1998; Jarosch *et al.*, 2002; Kikkert *et al.*, 2001). Das Ubiquitinierungssystem der Hefe, welches teilweise gebunden an der zytosolischen Seite der ER-Membran vorliegt, besteht aus E2- und E3-Enzymen (Römisch, 2005). Wie bereits gezeigt werden konnte, resultieren Mutationen in dieser Ubiquitinierungsmaschinerie nicht in der Akkumulation von K28 im ER (Eisfeld, 2001; Heiligenstein *et al.*, 2006). Da die β -Untereinheit von K28 im Gegensatz zur α -Untereinheit im Zytosol einer sensitiven Zelle ubiquitiniert vorliegt (Eisfeld, 2001; Heiligenstein *et al.*, 2006) sollte geklärt werden, inwieweit dies für die Toxizität von K28 verantwortlich ist. Der Austausch des einzigen Lysin-Restes in der β -Untereinheit verhinderte weder die Retrotranslokation des Toxins noch dessen toxische Wirkung. Weitere Untersuchungen an einer komplett Lysin-freien Toxinvariante, in der nicht nur der Lysinrest der β -Untereinheit, sondern auch die drei Lysin-Reste der α -Untereinheit gegen Arginin ausgetauscht wurden, wiesen eine unveränderte *in-vivo*-Abtötungs-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Toxin auf. Zellfraktionierungsexperimente bewiesen eine ungehinderte Retrotranslokation der Toxinvariante ins Zytosol. Eine Coimmunpräzipitation mit anti-Ub und anti- β zeigte keine Ubiquitinierung der β -Untereinheit mehr. Es kann also gefolgert werden, dass *in vivo* keine K28-Ubiquitinierung vorliegen muss, um eine Retrotranslokation des Toxins zu gewährleisten. Ein geringer Lysingehalt ist eine allgemeine Eigenschaft aller Toxin-Untereinheiten, die über die ER-Membran translozieren (Deeks *et al.*, 2002; Hazes and Read, 1997). RTA, die Cholera-Toxin-A-Kette und das A-Fragment des Shiga-ähnlichen Toxins enthalten jeweils zwei Lysin-Reste, *Pseudomonas* exotoxin A enthält drei, das hitzelabile *E. coli* Enterotoxin einen und Pertussis Toxin keinen Lysin-Rest. Im Gegensatz dazu zeigen Toxine, die das Zytosol über Endosomen erreichen, einen deutlich höheren Gehalt an Lysinen. Das Diphtherie-Toxin besitzt beispielsweise 16 Lysine. Die Beobachtung, dass alle Toxine, die über das ER ins Zytosol gelangen, einen

extrem geringen Gehalt an Lysinen aufweisen, deutet auf eine evolutive Strategie hin, der Markierung durch Ubiquitin und schließlich dem Abbau am Proteasom zu entgehen. Als Konsequenz könnte dies bedeuten, dass die noch vorhandenen Lysin-Reste der α - und β -Untereinheit von K28 keine bevorzugten Substrate der Ubiquitinierung darstellen. Die Ubiquitinierung von K28- β ist also weder für den Toxin-Export, noch für die Toxizität von K28 notwendig. Im Einklang mit dieser These steht auch die Beobachtung, dass *pre1-1* und *pre2-2* Mutanten keine Stabilisierung des K28-Toxins im ER bewirken. Die sechs ATPase-Untereinheiten innerhalb des 19S Cap's des Proteasoms stellen möglicherweise die treibende Kraft für die Retrotranslokation ubiquitiniertes Proteine dar (Brodsky and McCracken, 1999; Mayer *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1998; Yu and Kopito, 1999). Keinen Einfluss auf die Toxizität zeigten auch Cdc48p und seine Interaktionspartner Ufd1p und Npl4. Ye und Mitarbeiter (2001) postulierten, dass der Komplex aus Cdc48/p97-Ufd1p-Npl4p Proteine aus der ER-Membran für den zytosolischen Abbau extrahiert. Rabinovich und Mitarbeiter (2002) vermuten eine Assistenz des Cdc48p-Komplexes auf der zytosolischen Seite des ER bei der Dislokation von ERAD-Substraten, der in einem ATP-verbrauchenden Prozess Proteine für den Abbau am Proteasom aus der ER-Membran zieht. Gestützt auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann postuliert werden, dass die Ubiquitinierung der β -Untereinheit des K28-Toxins ein sekundärer Effekt ist und nicht für die ER-Zytosol-Translokation gebraucht wird. Der ER-Export von K28 ist möglicherweise ähnlich der Retrotranslokation von Calreticulin, für die eine Unabhängigkeit von Ubiquitinierung und Proteasom-Aktivität gezeigt werden konnte (Afshar *et al.*, 2005). Wie jedoch genau dieser Vorgang ablaufen könnte, ist noch nicht bekannt. Möglicherweise katalysieren beide Proteine den Membranübertritt selber durch ihre Fähigkeit sich im Zytosol wieder zu falten. Auch für die Cholera-Toxin-A-Kette und den pp α -Faktor konnte eine Ubiquitin- und Cdc48p-Komplex-unabhängige Retrotranslokation gezeigt werden, wobei jedoch der pp α -Faktor auf das Proteasom für die ER-Translokation angewiesen ist (Kothe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004). Es wird postuliert, dass die unterschiedlichen ERAD-Substrate ganz individuell dem Abbau am Proteasom zugeführt werden, was auch

durch die Beobachtung gestützt wird, dass bis jetzt noch keine ERAD-Substrate beschrieben wurden, die eine identische Protein-Maschinerie für ihren Abbau benutzen (Lee *et al.*, 2004).

4.3 Modell der Toxinwirkung

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann ein Modell für die Toxinwirkung postuliert werden (Abbildung 41). Das K28-Toxin wird nach der Bindung an den Primärrezeptor auf die Ebene der Plasmamembran transferiert und bindet dort an den sekundären Membranrezeptor Erd2p. Die Bindung des Toxins stimuliert die Phosphorylierung und die anschließende Monoubiquitinierung von Erd2p durch das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc4p und die Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p. Das NPF-Motiv am C-Terminus von Erd2p fungiert als Internalisierungssignal. Über Clathrin-vermittelte Endozytose gelangt der Toxin-Rezeptor-Komplex in die sensitive Zelle. Das an den Komplex gebundene Ubiquitin wird durch das deubiquitinierende Enzym Doa4p wieder freigesetzt und ein Großteil des Toxins gelangt zum Abbau in die Vakuole. Aus dem frühen Endosom und dem prävakuolären Kompartiment wird der Komplex aus K28-Toxin und HDEL-Rezeptor zum Golgi-Apparat dirigiert, von wo aus der Transport in das ER stattfindet. Mit Hilfe der Chaperone Kar2p, Scj1p und Jem1p sowie der Protein-Disulfid-Isomerase findet der Export des K28-Toxins Ubiquitin-unabhängig über das Sec61-Translokon ins Zytosol statt. Dort dissoziiert das Heterodimer in seine beiden Untereinheiten; β wird ubiquitiniert und abgebaut, während die zytotoxische α -Komponente durch passive Diffusion in den Zellkern gelangt und einen Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang und einen DNA-Synthese-Stopp induziert.



R1: Primärrezeptor

R2: Sekundärrezeptor

Abbildung 41: Modell der Toxinwirkung (Erläuterungen siehe Text)

5 Zusammenfassung

K28-Killerstämme der Hefe *S. cerevisiae* sezernieren ein nicht-glykosyliertes Protein-Toxin, das sensitive Hefen in einem rezeptorvermittelten Prozeß abtötet, indem es im Zellkern einen Zellzyklusarrest auslöst und die DNA-Synthese inhibiert. Ziel der Arbeit war die nähere Charakterisierung von Endozytose, Ubiquitinierung und retrogradem Toxintransport in K28-behandelten Hefezellen.

Es wurde gezeigt, dass es sich bei dem sekundären Membranrezeptor des K28-Toxins um den HDEL-Rezeptor Erd2p handelt. Eine Δ *erd2* Deletionsmutante war nicht in der Lage, Toxin endozytotisch aufzunehmen. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte Erd2p in einer Endozytose-defekten *end3* Mutante in der Plasmamembran durch die Kolokalisation mit der Plasmamembran-ATPase Pmr1p nachgewiesen werden.

Als Endozytosesignal fungiert, neben der NPF-Sequenz im Plasmamembranrezeptor Erd2p, auch eine Markierung durch Ubiquitin, die durch das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc4p und die Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5p erfolgt. Mutanten dieser Enzyme (*rsp5-1*, *ubc4*) verhielten sich toxinresistent und waren nicht mehr in der Lage K28-Toxin zu internalisieren.

Die endozytotische Aufnahme des viralen K28-Toxins verläuft durch einen Clathrin- und Aktin-vermittelten Prozess unter Beteiligung des AP2-Komplexes. Komponenten dieses Systems wurden in einem Screen von Deletionsmutanten identifiziert.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p essentiell für den Toxin-Export aus dem ER in das Zytosol einer sensitiven Zelle ist. Der toxinresistente Phänotyp einer *pdi1* Mutanten und die vollständige Wiederherstellung einer K28-Sensitivität durch

plasmidgetriebene Expression von Wildtyp Pdi1p belegten dies. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann gefolgert werden, dass es die Isomerase-Aktivität und nicht die Oxidase-Aktivität der PDI ist, die für den ER-Zytosol-Übertritt von K28 benötigt wird. An der Retrotranslokation beteiligt sind ebenfalls die ER-luminalen Chaperone Scj1p und Jem1p. Ein Einfluss der zytosolischen Chaperone konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Transport des K28-Toxins aus dem ER ist abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration im Sekretionsweg der Hefe. Eine Mutante mit einem Defekt in der Ionen-Pumpe Pmr1p zeigte sich toxinresistent und nicht mehr in der Lage, das Toxin aus dem ER in das Zytosol zu entlassen. Die Sensitivität dieser Mutante konnte durch Zugabe von 40 mM Ca^{2+} vollständig wiederhergestellt werden.

Eine Beteiligung des Cdc48/Ufd4p/Npl1p-Komplexes und des Proteasoms am Export von K28 aus dem ER in das Zytosol konnte ausgeschlossen werden. Ein Austausch des einzigen Lysinrestes in der β -Untereinheit zeigte keinen Einfluss auf die Toxizität von K28. Eine komplett Lysin-freien Toxinvariante, in der nicht nur der Lysinrest der β -Untereinheit, sondern auch die drei Lysin-Reste der α -Untereinheit gegen Arginin ausgetauscht wurden, wies eine unveränderte *in-vivo*-Abtötungs-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Toxin auf. Zellfraktionierungsexperimente bewiesen eine ungehinderte Retrotranslokation der Toxinvariante ins Zytosol. Eine Coimmunpräzipitation mit anti-Ub und anti- β zeigte keine Ubiquitinierung der β -Untereinheit mehr. Es kann also gefolgert werden, dass *in vivo* keine K28-Ubiquitinierung vorliegen muss, um eine Retrotranslokation des Toxins zu gewährleisten.

6 Summary

K28 killer strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* secrete a non-glycosylated protein toxin which kills sensitive yeast cells in a receptor-mediated process by inducing a cell cycle arrest in the nucleus and an inhibition of DNA synthesis.

The main objective of this thesis was the characterization of endocytosis, ubiquitination, and retrograde transport in K28-treated yeast cells.

The secondary membrane receptor of K28 toxin has very recently been identified as the HDEL receptor Erd2p. It could be shown that an Δ *erd2* mutant was no longer capable to take up the toxin via the endocytotic machinery. By immunofluorescence microscopy, Erd2p could be detected in the plasma membrane of an endocytosis defective Δ *end3* mutant colocalized with the plasma membrane ATPase Pmr1p.

Within the sequence of the plasma membrane receptor Erd2p, the motive NPF acts as an endocytosis signal, as well as an ubiquitination mediated by the ubiquitin-conjugation enzyme Ubc4p and the ubiquitin-protein-ligase Rsp5p. Mutants defective in these enzymes were toxin resistant and no longer capable to internalize K28 toxin as was shown by toxin uptake studies in the mutant cells.

The endocytosis of the virally encoded K28 toxin is based on a clathrin- and actin-mediated process in cooperation with the AP2 complex. Components of this system could be identified by a screen of deletion mutants.

Within this thesis the function of the protein disulfid isomerase was shown to be essential for the export of K28 from the ER to the cytosol of a sensitive yeast cell. This is based on the toxin resistant phenotype of a Δ *pdi1* mutant and its conversion to sensitivity after coexpression of wild-type Pdi1p. It could

be concluded that it is the unfolding activity rather than its oxidase activity that is required for ER cytosol transport of K28.

In addition, the ER luminal chaperones Scj1p and Jem1p play an important role in toxin retrotranslocation. An influence of cytosolic chaperones in this mechanism could so far not be shown.

The transport of K28 out of the ER is dependent on the Ca^{2+} -concentration in the secretory pathway of a yeast cell. A mutant defective in the ion pump Pmr1p was toxin resistant and unable to release the toxin from the ER into the cytosol. Sensitivity of this mutant could be fully restored by increasing the extracellular Ca^{2+} concentration up to 40 mM.

An involvement of the Cdc48/Ufd4p/Npl1p complex and the proteasom in retrotranslocation of K28 could be excluded. Substitution of the only internal lysine residue in the β -subunit showed no influence on toxicity.

A toxin variant in which all four lysin residues had been converted to arginine ($\alpha^{\text{K-0}}/\beta^{\text{K-0}}$ variant) showed almost identical *in vivo* killing activity as the wild-type toxin. Cell fractionation on yeast treated with wild-type toxin or its $\alpha^{\text{K-0}}/\beta^{\text{K-0}}$ mutant variant confirmed that in either case the α/β toxin is present in the cytosol, demonstrating that retrotranslocation is not prevented in a toxin devoid of internal ubiquitination. Furthermore a toxin-specific ubiquitination was not detectable in the cytosol of $\alpha^{\text{K-0}}/\beta^{\text{K-0}}$ -treated cells.

7 Literatur

- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., and van der Goot, F. G. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol* 160, 321-328.
- Afshar, N., Black, B. E., and Paschal, B. M. (2005). Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol Cell Biol* 25, 8844-8853.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1990). *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Amberg, D. C., Basart, E., and Botstein, D. (1995). Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat Struct Biol* 2, 28-35.
- Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S., and Hochstrasser, M. (2000). The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 11, 3365-3380.
- Anderson, B. L., Boldogh, I., Evangelista, M., Boone, C., Greene, L. A., and Pon, L. A. (1998). The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *J Cell Biol* 141, 1357-1370.
- Baggett, J. J., and Wendland, B. (2001). Clathrin function in yeast endocytosis. *Traffic* 2, 297-302.
- Balguerie, A., Sivadon, P., Bonneu, M., and Aigle, M. (1999). Rvs167p, the budding yeast homolog of amphiphysin, colocalizes with actin patches. *J Cell Sci* 112, 2529-2537.
- Baluna, R., Coleman, E., Jones, C., Ghetie, V., and Vitetta, E. S. (2000). The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. *Exp Cell Res* 258, 417-424.
- Barth, H., Blocker, D., Behlke, J., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Benz, R., and Aktories, K. (2000). Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J Biol Chem* 275, 18704-18711.
- Barth, H., Pfeifer, G., Hofmann, F., Maier, E., Benz, R., and Aktories, K. (2001). Low pH-induced formation of ion channels by clostridium difficile toxin B in target cells. *J Biol Chem* 276, 10670-10676.

- Beaudenon, S. L., Huacani, M. R., Wang, G., McDonnell, D. P., and Huibregtse, J. M. (1999). Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 6972-6979.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E. A. (1996). Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol Cell Biol* 16, 4378-4386.
- Berkower, C., Loayza, D., and Michaelis, S. (1994). Metabolic instability and constitutive endocytosis of STE6, the α -factor transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 5, 1185-1198.
- Bertram, S., and Gassen, H. G. (1991). *Gentechnische Methoden*, Verlag Stuttgart-Jena-New York).
- Bevan, E. A., Herring, A. J., and Mitchell, D. J. (1973). Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature* 245, 81-86.
- Bevan, E. A., and Makover, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc Int Cong Genet XI*, 1202-1203.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 278, 1806-1809.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blewitt, M. G., Chung, L. A., and London, E. (1985). Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochem* 24, 5458-5464.
- Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G., and Pagano, M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* 115, 71-82.
- Booth, C., and Koch, G. L. (1989). Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* 59, 729-737.
- Bordallo, J., Plemper, R. K., Finger, A., and Wolf, D. H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9, 209-222.
- Braspenning, J., Meschede, W., Marchini, A., Muller, M., Gissmann, L., and Tommasino, M. (1998). Secretion of heterologous proteins from *Schizosaccharomyces pombe* using the homologous leader

- sequence of *pho1+* acid phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 166-171.
- Breinig, F., Sendzik, T., Einfeld, K., Schmitt, M. J. (2006). Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *PNAS* **103**, 3810-38105
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J* **17**, 5964-5973.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 517-568.
- Brodsky, J. L., and McCracken, A. A. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 507-513.
- Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goekeler, J. L., Kruse, K. B., and McCracken, A. A. (1999). The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* **274**, 3453-3460.
- Broker, M., Ragg, H., and Karges, H. E. (1987). Expression of human antithrombin III in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* **908**, 203-213.
- Brymora, A., Cousin, M. A., Roufogalis, B. D., and Robinson, P. J. (2001). Enhanced protein recovery and reproducibility from pull-down assays and immunoprecipitations using spin columns. *Anal Biochem* **295**, 119-122.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Bussey, H., and Skipper, N. (1975). Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *J Bacteriol* **124**, 476-483.
- Butler, A. R., White, J. H., Folawiyo, Y., Edlin, A., Gardiner, D., and Stark, M. J. (1994). Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin. *Mol Cell Biol* **14**, 6306-6316.
- Chaudhary, V. K., Jinno, Y., FitzGerald, D., and Pastan, I. (1990). *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl

- terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 308-312.
- Chu, D. S., Pishvaei, B., and Payne, G. S. (1996). The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 33123-33130.
- Chvatchko, Y., Howald, I., and Riezman, H. (1986). Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response. *Cell* 46, 355-364.
- Ciechanover, A., and Schwartz, A. L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of protein death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2727-2730.
- Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K., and Henwood, C. A. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105, 205-212.
- Collier, R. J. (2001). Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 39, 1793-1803.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Cronin, S. R., Rao, R., and Hampton, R. Y. (2002). Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J Cell Biol* 157, 1017-1028.
- Czaran, T. L., and Hoekstra, R. F. (2003). Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270, 1373-1378.
- Dausend, J. (2006) Untersuchungen zur endocytotischen Internalisierung des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p in Hefe, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- de Virgilio, M., Weniger, H., and Ivessa, N. E. (1998). Ubiquitination is required for the retro-translocation of short-lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 273, 9734-9743.
- Decottignies, A., Owsianik, G., and Ghislain, M. (1999). Casein kinase I-dependent phosphorylation and stability of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* 274, 37139-37146.
- Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M., and Lord, J. M. (2002). The low lysine content of ricin A chain reduces the risk

- of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem* 41, 3405-3413.
- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3, 280-291.
- D'Hondt, K., Heese-Peck, A., and Riezman, H. (2000). Protein and lipid requirements for endocytosis. *Annu Rev Genet* 34, 255-295.
- Dinman, J. D., and Wickner, R. B. (1992). Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol* 66, 3669-3676.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-6145.
- Draper, R. K., and Simon, M. I. (1980). The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol* 87, 849-854.
- Dunn, R., and Hicke, L. (2001). Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol Biol Cell* 12, 421-435.
- Dupre, S., and Haguenaer-Tsapis, R. (2001). Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol* 21, 4482-4494.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H., and Rudolph, H. K. (1998). The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* 9, 1149-1162.
- Eiden-Plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F., and Schmitt, M. J. (2004). Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol* 70, 961-966.
- Eisfeld, K. (2001) Endocytose und retrograder Proteintransport am Beispiel des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J., and Schmitt, M. J. (2000). Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* 37, 926-940.
- Ekena, K., Vater, C. A., Raymond, C. K., and Stevens, T. H. (1993). The VPS1 protein is a dynamin-like GTPase required for sorting proteins

- to the yeast vacuole. *Ciba Found Symp* 176, 198-211; discussion 211-194.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.
- Fagioli, C., Mezghrani, A., and Sitia, R. (2001). Reduction of interchain disulfide bonds precedes the dislocation of Ig- μ chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 276, 40962-40967.
- Falnes, P. O., and Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* 12, 407-413.
- Fang, H., and Green, N. (1994). Nonlethal *sec71-1* and *sec72-1* mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S. cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 5, 933-942.
- Fivaz, M., Abrami, L., Tsitrin, Y., and van der Goot, F. G. (2001). Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* and related toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 257, 35-52.
- Forgac, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* 274, 12951-12954.
- Forster, M. L., Sivick, K., Park, Y. N., Arvan, P., Lencer, W. I., and Tsai, B. (2006). Protein disulfide isomerase-like proteins play opposing roles during retrotranslocation. *J Cell Biol* 173, 853-859.
- Frand, A. R., and Kaiser, C. A. (1998). The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1, 161-170.
- Fujimura, T., and Wickner, R. B. (1992). Interaction of two cis sites with the RNA replicase of the yeast L-A virus. *J Biol Chem* 267, 2708-2713.
- Gagny, B., Wiederkehr, A., Dumoulin, P., Winsor, B., Riezman, H., and Haguenaer-Tsapis, R. (2000). A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci* 113, 3309-3319.
- Galan, J. M., and Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 16, 5847-5854.
- Gammie, A. E., Kurihara, L. J., Vallee, R. B., and Rose, M. D. (1995). DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J Cell Biol* 130, 553-566.
- Geli, M. I., and Riezman, H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272, 533-535.

- Ghabrial, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16, 119-131.
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., de La Cruz, F. J., and Romisch, K. (1999). Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol* 147, 1443-1456.
- Goley, E. D., and Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 713-726.
- Golubev, W., and Shabalín, Y. (1994). Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol Lett* 119, 105-110.
- Gray, A. J., Park, P. W., Broekelmann, T. J., Laurent, G. J., Reeves, J. T., Stenmark, K. R., and Mecham, R. P. (1995). The mitogenic effects of the B beta chain of fibrinogen are mediated through cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 270, 26602-26606.
- Griffiths, S. L., Finkelstein, R. A., and Critchley, D. R. (1986). Characterization of the receptor for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestinal brush borders. *Biochem J* 238, 313-322.
- Grunow, A., Rusing, M., Becker, B., and Melkonian, M. (1999). V-ATPase is a major component of the Golgi complex in the scaly green flagellate *Scherffelia dubia*. *Protist* 150, 265-281.
- Gunge, N. (1986). Linear DNA killer plasmids from the yeast *Kluyveromyces*. *Yeast* 2, 153-162.
- Haigis, M. C., and Raines, R. T. (2003). Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Sci* 116, 313-324.
- Hatakeyama, S., Jensen, J. P., and Weissman, A. M. (1997). Subcellular localization and ubiquitin-conjugating enzyme (E2) interactions of mammalian HECT family ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem* 272, 15085-15092.
- Haynes, C. M., Caldwell, S., and Cooper, A. A. (2002). An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J Cell Biol* 158, 91-101.
- Hazes, B., and Read, R. J. (1997). Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochem* 36, 11051-11054.

- Heiligenstein, S., Eisfeld, K., Sendzik, T., Jimenez-Becker, N., Breinig, F., and Schmitt, M. J. (2006). Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *EMBO J* 25, 4717-4727.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y., and Wolf, D. H. (1993). PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* 268, 5115-5120.
- Heintel, T., Zagorc, T., and Schmitt, M. J. (2001). Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 165-172.
- Herman, P. K., Stack, J. H., and Emr, S. D. (1992). An essential role for a protein and lipid kinase complex in secretory protein sorting. *Trends Cell Biol* 2, 363-368.
- Hermann, G. J., and Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 265-303.
- Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-172.
- Hicke, L., and Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-287.
- Hicke, L., Zanolari, B., and Riezman, H. (1998). Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 141, 349-358.
- Hirst, J., and Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* 1404, 173-193.
- Hochstrasser, M., Ellison, M. J., Chau, V., and Varshavsky, A. (1991). The short-lived MAT α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4606-4610.
- Hodgson, V. J., Button, D., and Walker, G. M. (1995). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology* 141, 2003-2012.
- Holst, B., Tachibana, C., and Winther, J. R. (1997). Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 138, 1229-1238.

- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.
- Howard, J. P., Hutton, J. L., Olson, J. M., and Payne, G. S. (2002). Sla1p serves as the targeting signal recognition factor for NPF(1,2)D-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 157, 315-326.
- Huang, K. M., Gullberg, L., Nelson, K. K., Stefan, C. J., Blumer, K., and Lemmon, S. K. (1997). Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *J Cell Sci* 110, 899-910.
- Huckaba, T. M., Gay, A. C., Pantalena, L. F., Yang, H. C., and Pon, L. A. (2004). Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 167, 519-530.
- Hudson, T. H., and Neville, D. M., Jr. (1985). Quantal entry of diphtheria toxin to the cytosol. *J Biol Chem* 260, 2675-2680.
- Icho, T., and Wickner, R. B. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem* 264, 6716-6723.
- Ikeda, M., Ikeda, A., and Longnecker, R. (2002). Lysine-independent ubiquitination of Epstein-Barr virus LMP2A. *Virology* 300, 153-159.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.
- Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, A., and Keusch, G. T. (1986). Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J Exp Med* 163, 1391-1404.
- Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J., and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* 3, 530-536.
- Jenness, D. D., and Spatrick, P. (1986). Down regulation of the alpha-factor pheromone receptor in *S. cerevisiae*. *Cell* 46, 345-353.
- Kagayama, S., Aiba, T., Kadowaki, K., and Kimura, A. (1988). New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. *Agri Biol Chem* 52, 1-7.

- Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2006). Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 404-414.
- Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.
- Kelley, W. L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* 23, 222-227.
- Kelm, K. B., Huyer, G., Huang, J. C., and Michaelis, S. (2004). The internalization of yeast Ste6p follows an ordered series of events involving phosphorylation, ubiquitination, recognition and endocytosis. *Traffic* 5, 165-180.
- Kikkert, M., Hassink, G., Barel, M., Hirsch, C., van der Wal, F. J., and Wiertz, E. (2001). Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem J* 358, 369-377.
- Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69, 699-727.
- Klappa, P., Ruddock, L. W., Darby, N. J., and Freedman, R. B. (1998). The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *EMBO J* 17, 927-935.
- Kothe, M., Ye, Y., Wagner, J. S., De Luca, H. E., Kern, E., Rapoport, T. A., and Lencer, W. I. (2005). Role of p97 AAA-ATPase in the retrotranslocation of the cholera toxin A1 chain, a non-ubiquitinated substrate. *J Biol Chem* 280, 28127-28132.
- Kounnas, M. Z., Morris, R. E., Thompson, M. R., FitzGerald, D. J., Strickland, D. K., and Saelinger, C. B. (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* 267, 12420-12423.
- Kubler, E., and Riezman, H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* 12, 2855-2862.
- Kucharczyk, R., and Rytka, J. (2001). *Saccharomyces cerevisiae*--a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochim Pol* 48, 1025-1042.
- Kurjan, J. (1985). Alpha-factor structural gene mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on alpha-factor production and mating. *Mol Cell Biol* 5, 787-796.

- Lee, J., Colwill, K., Aneliunas, V., Tennyson, C., Moore, L., Ho, Y., and Andrews, B. (1998). Interaction of yeast Rvs167 and Pho85 cyclin-dependent kinase complexes may link the cell cycle to the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 8, 1310-1321.
- Lee, R. J., Liu, C. W., Harty, C., McCracken, A. A., Latterich, M., Romisch, K., DeMartino, G. N., Thomas, P. J., and Brodsky, J. L. (2004). Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J* 23, 2206-2215.
- Lee, S. Y., Cherla, R. P., Caliskan, I., and Tesh, V. L. (2005). Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism. *Infect Immun* 73, 5115-5126.
- Lewis, M. J., and Pelham, H. R. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163.
- Lindberg, M. J., Normark, J., Holmgren, A., and Oliveberg, M. (2004). Folding of human superoxide dismutase: disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15893-15898.
- Liu, K., Hua, Z., Nepute, J. A., and Graham, T. R. (2007). Yeast P4-ATPases Drs2p and Dnf1p are essential cargos of the NPFxD/Sla1p endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 18, 487-500.
- Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S., and Brodsky, F. M. (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* 83, 257-267.
- Lodish, H. F., and Kong, N. (1990). Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265, 10893-10899.
- Lombardi, R., and Riezman, H. (2001). Rvs161p and Rvs167p, the two yeast amphiphysin homologs, function together in vivo. *J Biol Chem* 276, 6016-6022.
- Lord, J. M., Ceriotti, A., and Roberts, L. M. (2002). ER dislocation: Cdc48p/p97 gets into the AAAct. *Curr Biol* 12, R182-184.
- Lord, J. M., Roberts, L. M., and Robertus, J. D. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J* 8, 201-208.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., and Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 10, 369-400.
- Majoul, I. V., Bastiaens, P. I., and Soling, H. D. (1996). Transport of an external Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) protein from the plasma membrane

- to the endoplasmic reticulum: studies with cholera toxin in Vero cells. *J Cell Biol* 133, 777-789.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B., and Johannes, L. (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* 143, 973-990.
- Manolson, M. F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A., and Jones, E. W. (1994). STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p. *J Biol Chem* 269, 14064-14074.
- Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D. (1998). A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* 18, 314-321.
- Maurer, J. (1999) Die *SKI*-Gene der Hefe und deren Effekt auf den 3'-5' exonukleolytischen Abbau viraler M28(+)-ssRNA., Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Mayer, T. U., Braun, T., and Jentsch, S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J* 17, 3251-3257.
- McCracken, A. A., and Brodsky, J. L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132, 291-298.
- McCracken, D. A., Martin, V. J., Stark, M. J., and Bolen, P. L. (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 140, 425-431.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55, 663-700.
- Mermall, V., Post, P. L., and Mooseker, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279, 527-533.
- Montecucco, C., Schiavo, G., and Tomasi, M. (1985). pH-dependence of the phospholipid interaction of diphtheria-toxin fragments. *Biochem J* 231, 123-128.
- Moreau, V., Galan, J. M., Devilliers, G., Haguenaer-Tsapis, R., and Winsor, B. (1997). The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol Biol Cell* 8, 1361-1375.

- Moriyama, Y., and Nelson, N. (1989). H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures. *J Biol Chem* 264, 18445-18450.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N., and Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 162, 909-918.
- Mullis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48, 579-582.
- Munn, A. L. (2000). The yeast endocytic membrane transport system. *Microsc Res Tech* 51, 547-562.
- Munn, A. L., and Riezman, H. (1994). Endocytosis is required for the growth of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* 127, 373-386.
- Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-1061.
- Navarro, P., Durrens, P., and Aigle, M. (1997). Protein-protein interaction between the RVS161 and RVS167 gene products of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1343, 187-192.
- Nelson, N., and Harvey, W. R. (1999). Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79, 361-385.
- Newpher, T. M., and Lemmon, S. K. (2006). Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* 7, 574-588.
- Newpher, T. M., Smith, R. P., Lemmon, V., and Lemmon, S. K. (2005). In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell* 9, 87-98.
- Nishikawa, S., and Endo, T. (1997). The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. *J Biol Chem* 272, 12889-12892.
- Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L., and Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* 153, 1061-1070.
- Norgaard, P., Westphal, V., Tachibana, C., Alsoe, L., Holst, B., and Winther, J. R. (2001). Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol* 152, 553-562.

- Nothwehr, S. F., Conibear, E., and Stevens, T. H. (1995). Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in *vps1* mutant yeast cells via the plasma membrane. *J Cell Biol* 129, 35-46.
- Ohtake, Y., and Wickner, R. B. (1995). Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Mol Cell Biol* 15, 2772-2781.
- Paifer, E., Margolles, E., Cremata, J., Montesino, R., Herrera, L., and Delgado, J. M. (1994). Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast* 10, 1415-1419.
- Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K., and Robinson, L. C. (1997). Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J* 16, 4194-4204.
- Papa, F. R., and Hochstrasser, M. (1993). The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene. *Nature* 366, 313-319.
- Pastan, I., Chaudhary, V., and FitzGerald, D. J. (1992). Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem* 61, 331-354.
- Payne, G. S., and Schekman, R. (1989). Clathrin: a role in the intracellular retention of a Golgi membrane protein. *Science* 245, 1358-1365.
- Pelham, H. R. (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 15, 483-486.
- Pelham, H. R. (2002). Insights from yeast endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14, 454-462.
- Pelham, H. R., Hardwick, K. G., and Lewis, M. J. (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J* 7, 1757-1762.
- Pelham, H. R., Roberts, L. M., and Lord, J. M. (1992). Toxin entry: how reversible is the secretory pathway? *Trends Cell Biol* 2, 183-185.
- Penalver, E., Lucero, P., Moreno, E., and Lagunas, R. (1999). Clathrin and two components of the COPII complex, Sec23p and Sec24p, could be involved in endocytosis of the *Saccharomyces cerevisiae* maltose transporter. *J Bacteriol* 181, 2555-2563.
- Peterson, M. R., Burd, C. G., and Emr, S. D. (1999). Vac1p coordinates Rab and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Vps45p-dependent vesicle docking/fusion at the endosome. *Curr Biol* 9, 159-162.
- Phan, H. L., Finlay, J. A., Chu, D. S., Tan, P. K., Kirchhausen, T., and Payne, G. S. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* APS1 gene encodes a

- homolog of the small subunit of the mammalian clathrin AP-1 complex: evidence for functional interaction with clathrin at the Golgi complex. *EMBO J* 13, 1706-1717.
- Piper, R. C., Whitters, E. A., and Stevens, T. H. (1994). Yeast Vps45p is a Sec1p-like protein required for the consumption of vacuole-targeted, post-Golgi transport vesicles. *Eur J Cell Biol* 65, 305-318.
- Pirneskoski, A., Ruddock, L. W., Klappa, P., Freedman, R. B., Kivirikko, K. I., and Koivunen, P. (2001). Domains b' and a' of protein disulfide isomerase fulfill the minimum requirement for function as a subunit of prolyl 4-hydroxylase. The N-terminal domains a and b enhances this function and can be substituted in part by those of ERp57. *J Biol Chem* 276, 11287-11293.
- Plempner, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D. H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.
- Plempner, R. K., Egner, R., Kuchler, K., and Wolf, D. H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* 273, 32848-32856.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., and Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382, 471-473.
- Preston, R. A., Murphy, R. F., and Jones, E. W. (1989). Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7027-7031.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K. U., Diamant, N., and Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* 22, 626-634.
- Rad, M. R., Phan, H. L., Kirchrath, L., Tan, P. K., Kirchhausen, T., Hollenberg, C. P., and Payne, G. S. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* Apl2p, a homologue of the mammalian clathrin AP beta subunit, plays a role in clathrin-dependent Golgi functions. *J Cell Sci* 108 (Pt 4), 1605-1615.
- Rappuoli, R., and Montecucco, C. (1997). *Guidbook to protein toxins and their use in cell biology*.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., and Riezman, H. (1993). end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 120, 55-65.

- Reiter, J. (2004) Untersuchungen zur Wirkungsweise eines viralen A/B-Toxins der Hefe: Kernlokalisierung, Apoptose und Zellzyklus-Arrest, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., and Schmitt, M. J. (2005). Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 168, 353-358.
- Ribas, J. C., Fujimura, T., and Wickner, R. B. (1994). Essential RNA binding and packaging domains of the Gag-Pol fusion protein of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 28420-28428.
- Ries, C. (2004) Untersuchungen zur Plasmamembran-Lokalisation des HDEL-Rezeptors Erd2p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Universität des Saarlandes.
- Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell* 40, 1001-1009.
- Riffer, F. (1999) Konstruktion ortsspezifischer Mutationen innerhalb der K28-Toxin kodierenden cDNA und Funktionsanalyse in *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Riffer, F., Einfeld, K., Breinig, F., and Schmitt, M. J. (2002). Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 148, 1317-1328.
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10, 961-974.
- Romisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 435-456.
- Rotin, D., Staub, O., and Haguenauer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176, 1-17.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J., and Silver, P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J Cell Biol* 109, 2665-2675.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H., and van Deurs, B. (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 358, 510-512.
- Sandvig, K., and Olsnes, S. (1980). Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* 87, 828-832.
- Sandvig, K., and Olsnes, S. (1981). Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. Characterization of the entry process and effects of low pH on the toxin molecule. *J Biol Chem* 256, 9068-9076.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Petersen, O. W., and van Deurs, B. (1987). Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J Cell Biol* 105, 679-689.
- Sandvig, K., Ryd, M., Garred, O., Schweda, E., Holm, P. K., and van Deurs, B. (1994). Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol* 126, 53-64.
- Sandvig, K., Spilsberg, B., Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L., Iversen, T. G., and van Deurs, B. (2004). Pathways followed by protein toxins into cells. *Int J Med Microbiol* 293, 483-490.
- Sandvig, K., and van Deurs, B. (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* 76, 949-966.
- Sandvig, K., and van Deurs, B. (2000). Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J* 19, 5943-5950.
- Sandvig, K., and van Deurs, B. (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 1-24.
- Sandvig, K., and van Deurs, B. (2005). Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* 12, 865-872.
- Santolini, E., Salcini, A. E., Kay, B. K., Yamabhai, M., and Di Fiore, P. P. (1999). The EH network. *Exp Cell Res* 253, 186-209.
- Schiavo, G., and van der Goot, F. G. (2001). The bacterial toxin toolkit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 530-537.
- Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R., and Silver, P. A. (1995). A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol* 129, 979-988.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66, 511-548.

- Schmitt, M., and Schernikau, G. (1997). Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Techn Biotechnol* 35, 281-285.
- Schmitt, M. J., and Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26, 257-276.
- Schmitt, M. J., and Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol* 4, 212-221.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schonig, I., and Tipper, D. J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology* 142 (Pt 9), 2655-2662.
- Schmitt, M. J., and Neuhausen, F. (1994). Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *J Virol* 68, 1765-1772.
- Schmitt, M. J., Poravou, O., Trenz, K., and Rehfeldt, K. (1997). Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J Virol* 71, 8852-8855.
- Schmitt, M. J., and Tipper, D. J. (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast* 8, 373-384.
- Seaman, M. N., McCaffery, J. M., Emr, S. D. (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol* 142, 665-681.
- Schoonderwoert, V. T., Holthuis, J. C., Tanaka, S., Tooze, S. A., and Martens, G. J. (2000). Inhibition of the vacuolar H⁺-ATPase perturbs the transport, sorting, processing and release of regulated secretory proteins. *Eur J Biochem* 267, 5646-5654.
- Seguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E., and Cailliez, J. C. (1998). Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22, 145-149.
- Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N., and Pelham, H. R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61, 1349-1357.
- Sendzig, T. (2003) Untersuchungen zur in vivo Toxizität und Immunität der Virustoxine K1 und K28 durch regulierte Expression einzelner Toxinuntereinheiten, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Shen, Y., and Bruenn, J. A. (1993). RNA structural requirements for RNA binding, replication, and packaging in the yeast double-stranded RNA virus. *Virology* 195, 481-491.

- Shigekawa, K., and Dower, W. J. (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6, 742-751.
- Shih, S. F., Wu, Y. H., Hung, C. H., Yang, H. Y., and Lin, J. Y. (2001). Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein. *J Biol Chem* 276, 21870-21877.
- Singer, J. D., Manning, B. M., and Formosa, T. (1996). Coordinating DNA replication to produce one copy of the genome requires genes that act in ubiquitin metabolism. *Mol Cell Biol* 16, 1356-1366.
- Sivadon, P., Bauer, F., Aigle, M., and Crouzet, M. (1995). Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast *rvs161* mutant: the Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol Gen Genet* 246, 485-495.
- Solovyov, A., Xiao, R., and Gilbert, H. F. (2004). Sulfhydryl oxidation, not disulfide isomerization, is the principal function of protein disulfide isomerase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 34095-34100.
- Somers, J. M., and Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genet Res* 13, 71-83.
- Sommer, T., and Seufert, W. (1992). Genetic analysis of ubiquitin-dependent protein degradation. *Experientia* 48, 172-178.
- Spindler, J. (2004) Untersuchungen zur endocytotischen Aufnahme und intrazellulären Expression von K28-Toxinderivaten in Hefe- und Säugerzellen, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Spooner, R. A., Smith, D. C., Easton, A. J., Roberts, L. M., and Lord, J. M. (2006). Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virology* 3, 26.
- Springael, J. Y., Galan, J. M., Haguenaer-Tsapis, R., and Andre, B. (1999). NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J Cell Sci* 112, 1375-1383.
- Srivastava, A., Woolford, C. A., and Jones, E. W. (2000). Pep3p/Pep5p complex: a putative docking factor at multiple steps of vesicular transport to the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 105-122.
- Stack, J. H., Horazdovsky, B., and Emr, S. D. (1995). Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 1-33.

- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A., and Phaff, H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol* 33, 783-796.
- Strayle, J., Pozzan, T., and Rudolph, H. K. (1999). Steady-state free Ca^{2+} in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 μM and is mainly controlled by the secretory pathway pump *pmr1*. *EMBO J* 18, 4733-4743.
- Sun, Y., Martin, A. C., and Drubin, D. G. (2006). Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev Cell* 11, 33-46.
- Swaminathan, S., Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 2583-2594.
- Tan, P. K., Davis, N. G., Sprague, G. F., and Payne, G. S. (1993). Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J Cell Biol* 123, 1707.
- Tan, P. K., Howard, J. P., and Payne, G. S. (1996). The sequence NPF_{XD} defines a new class of endocytosis signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 135, 1789-1800.
- Tang, H. Y., Munn, A., and Cai, M. (1997). EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 4294-4304.
- Tao, J., Ginsberg, I., Banerjee, N., Held, W., Koltin, Y., and Bruenn, J. A. (1990). *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol* 10, 1373-1381.
- Theisen, S., Molkenau, E., and Schmitt, M. J. (2000). Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Williopsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential. *J Microbiol Biotechnol* 10, 547-550.
- Tipper, D. J., and Schmitt, M. J. (1991). Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol* 5, 2331-2338.
- Tirosh, B., Furman, M. H., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2003). Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J Biol Chem* 278, 6664-6672.
- Tortorella, D., Story, C. M., Huppa, J. B., Wiertz, E. J., Jones, T. R., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., and Ploegh, H. L. (1998). Dislocation of type I membrane proteins from the ER to the cytosol is sensitive to changes in redox potential. *J Cell Biol* 142, 365-376.

- Toshima, J. Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A. C., King, D. S., and Drubin, D. G. (2006). Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5793-5798.
- Townsley, F. M., Frigerio, G., and Pelham, H. R. (1994). Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J Cell Biol* *127*, 21-28.
- Traub, L. M. (2005). Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* *1744*, 415-437.
- Tsai, B., and Rapoport, T. A. (2002). Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1. *J Cell Biol* *159*, 207-216.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., and Rapoport, T. A. (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* *104*, 937-948.
- Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T. A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 246-255.
- Vaduva, G., Martin, N. C., and Hopper, A. K. (1997). Actin-binding verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton. *J Cell Biol* *139*, 1821-1833.
- van Heyningen, S. (1974). Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* *186*, 656-657.
- Van Vuuren, H. J. J., and Jacobs, C. J. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am J Enol Vitic* *43*, 119-128.
- Vashist, S., Frank, C. G., Jakob, C. A., and Ng, D. T. (2002). Two distinctly localized p-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Mol Biol Cell* *13*, 3955-3966.
- Vida, T. A., and Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* *128*, 779-792.
- Vuori, K., Myllyla, R., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K. I. (1992). Expression and site-directed mutagenesis of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli*. This multifunctional polypeptide has two independently acting catalytic sites for the isomerase activity. *J Biol Chem* *267*, 7211-7214.

- Walker, K. W., Lyles, M. M., and Gilbert, H. F. (1996). Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine. *Biochem* 35, 1972-1980.
- Watts, C. (2002). Phagocytosis: how the phagosome became the phag-ER-some. *Curr Biol* 12, R666-668.
- Wendland, B., and Emr, S. D. (1998). Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J Cell Biol* 141, 71-84.
- Wendland, B., Steece, K. E., and Emr, S. D. (1999). Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *EMBO J* 18, 4383-4393.
- Wesche, J., Rapak, A., and Olsnes, S. (1999). Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem* 274, 34443-34449.
- Wickner, R. B. (1992). Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* 46, 347-375.
- Wickner, R. B. (1996). Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 30, 109-139.
- Wickner, R. B., Fujimura, T., and Esteban, R. (1986). Overview of double-stranded RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Basic Life Sci* 40, 149-163.
- Widner, W. R., and Wickner, R. B. (1993). Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Mol Cell Biol* 13, 4331-4341.
- Wiest, D. L., Bhandoola, A., Punt, J., Kreibich, G., McKean, D., and Singer, A. (1997). Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1884-1889.
- Wilcox, C. A., Redding, K., Wright, R., and Fuller, R. S. (1992). Mutation of a tyrosine localization signal in the cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol Biol Cell* 3, 1353-1371.
- Wileman, T., Kane, L. P., Carson, G. R., and Terhorst, C. (1991). Depletion of cellular calcium accelerates protein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266, 4500-4507.
- Woods, D. R., and Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 51, 115-126.

- Xiao, R., Solovyov, A., Gilbert, H. F., Holmgren, A., and Lundstrom-Ljung, J. (2001). Combinations of protein-disulfide isomerase domains show that there is little correlation between isomerase activity and wild-type growth. *J Biol Chem* 276, 27975-27980.
- Yamashiro, C. T., Kane, P. M., Wolczyk, D. F., Preston, R. A., and Stevens, T. H. (1990). Role of vacuolar acidification in protein sorting and zymogen activation: a genetic analysis of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Mol Cell Biol* 10, 3737-3749.
- Yao, W., Muqtadir, K., and Bruenn, J. A. (1995). Packaging in a yeast double-stranded RNA virus. *J Virol* 69, 1917-1919.
- Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 162, 71-84.
- Yeung, B. G., Phan, H. L., and Payne, G. S. (1999). Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 3643-3659.
- Ying, M., Flatmark, T., and Saraste, J. (2000). The p58-positive pre-golgi intermediates consist of distinct subpopulations of particles that show differential binding of COPI and COPII coats and contain vacuolar H(+)-ATPase. *J Cell Sci* 113, 3623-3638.
- Young, T. W., and Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek* 44, 59-77.
- Yu, H., and Kopito, R. R. (1999). The role of multiubiquitination in dislocation and degradation of the alpha subunit of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 274, 36852-36858.
- Zietkiewicz, S., Krzewska, J., and Liberek, K. (2004). Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* 279, 44376-44383.

8 Anhang

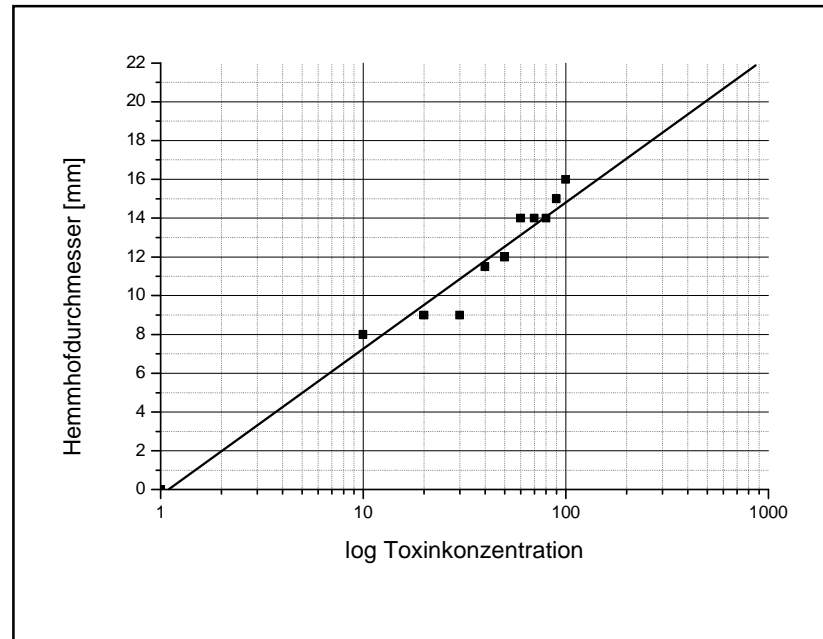


Abbildung 42: Eichgerade zur Ermittlung der halblogarithmischen Beziehung zwischen der Sensitivität des Stammes *S. cerevisiae* SEY6210 und steigenden Toxinkonzentrationen in Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar.

In Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar mit eingebettetem Wildtypstamm SEY6210 wurde in ein ausgestanztes Loch jeweils 100 µl verschiedener Toxinverdünnungen pipettiert, der Hemmhofdurchmesser nach dreitägiger Bebrütung bei 20°C bestimmt und die Werte halblogarithmisch aufgetragen. (Korrelationskoeffizient R:0,98)

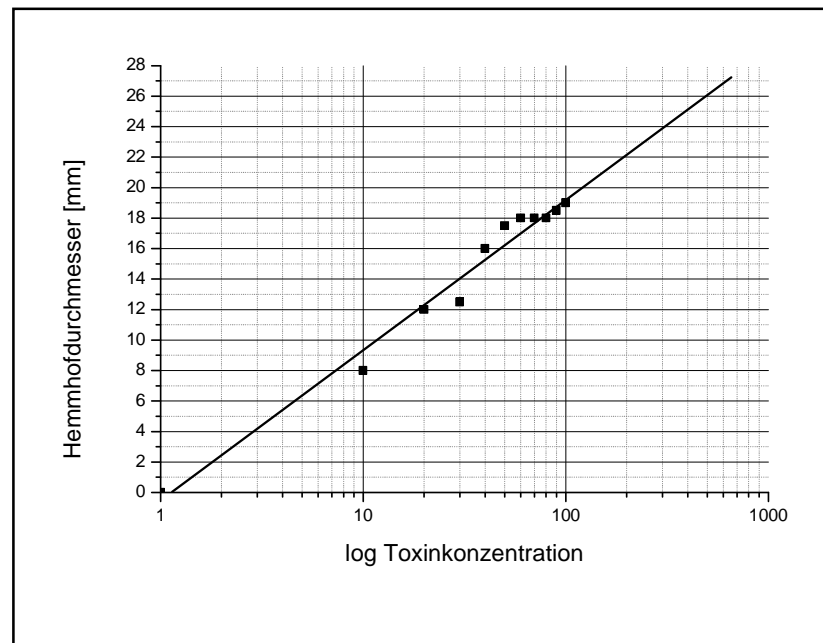


Abbildung 43: Eichgerade zur Ermittlung der halblogarithmischen Beziehung zwischen der Sensitivität des Stammes *S. cerevisiae* SEY6210 und steigenden Toxinkonzentrationen in Minimal-Methylenblau-Galactose-Agar.

In Minimal-Methylenblau-Galactose-Agar mit eingebettetem Wildtypstamm SEY6210 wurde in ein ausgestanztes Loch jeweils 100 μ l verschiedener Toxinverdünnungen pipettiert, der Hemmhofdurchmesser nach dreitägiger Bebrütung bei 20 $^{\circ}$ C bestimmt und die Werte halblogarithmisch aufgetragen. (Korrelationskoeffizient R:0,99)

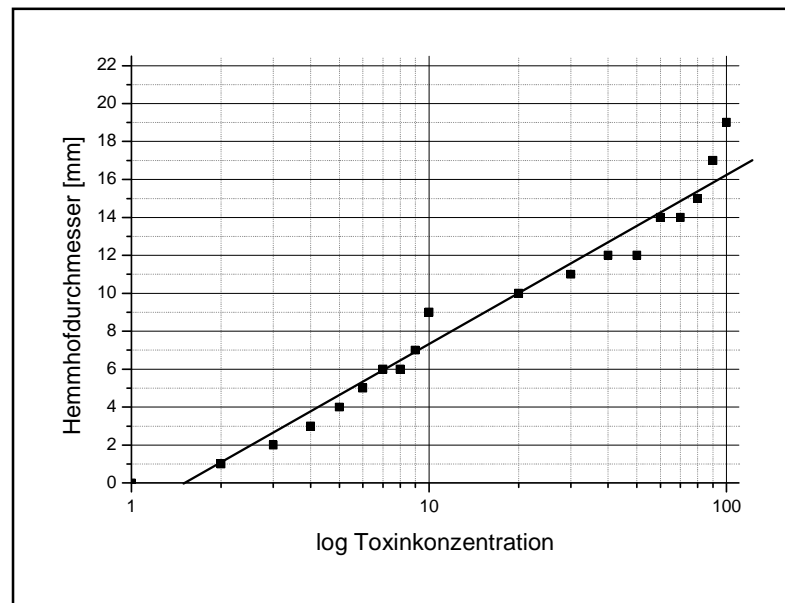


Abbildung 44: Eichgerade zur Ermittlung der halblogarithmischen Beziehung zwischen der Sensitivität des Stammes *S. cerevisiae* 192.2d und steigenden Toxinkonzentrationen in Methylenblau-Glukose-Agar.

In Methylenblau-Glukose-Agar mit eingebettetem Wildtypstamm 192.2d wurden in ein ausgestanztes Loch jeweils 100 μ l verschiedener Toxinverdünnungen pipettiert, der Hemmhofdurchmesser nach dreitägiger Bebrütung bei 20°C bestimmt und die Werte halblogarithmisch aufgetragen. (Korrelationskoeffizient R:0,98)

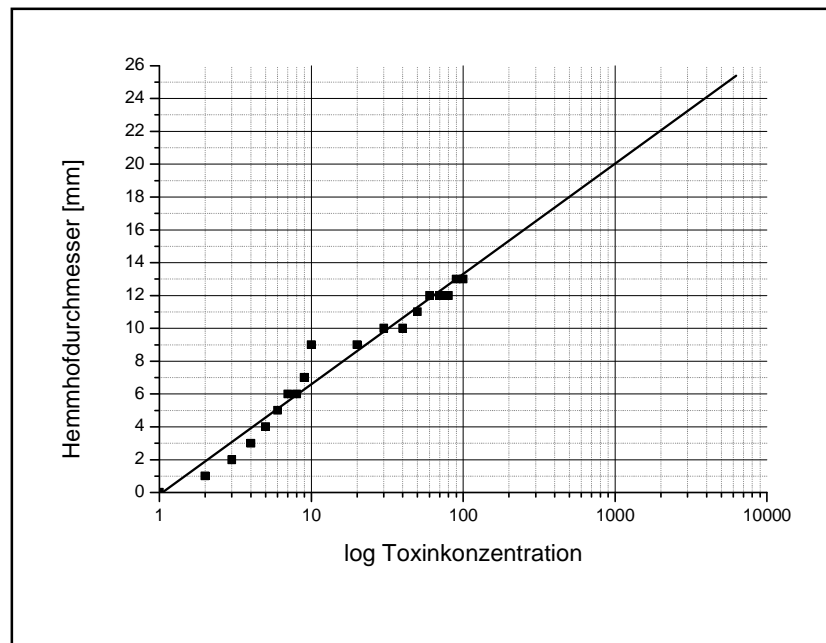


Abbildung 45: Eichgerade zur Ermittlung der halblogarithmischen Beziehung zwischen der Sensitivität des Stammes *S. cerevisiae* BY4742 und steigenden Toxinkonzentrationen in Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar.

In Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar mit eingebettetem Wildtypstamm BY4742 wurde in ein ausgestanztes Loch jeweils 100 μ l verschiedener Toxinverdünnungen pipettiert, der Hemmhofdurchmesser nach dreitägiger Bebrütung bei 20°C bestimmt und die Werte halblogarithmisch aufgetragen. (Korrelationskoeffizient R:0,98)

Tabelle 23: Auflistung des „Screenings“ der Hefemutanten mit Funktion der deletierten Genprodukte und ihrer Sensitivität gegen K28-Toxin.

Informationen zur Funktion der Proteine wurden der Protein-Datenbank MIPS (<http://mips.gsf.de>) entnommen. (K28-Sensitivität des Wildtyps BY4742: 13 mm, (--) resistent, (-) vermindert sensitiv, (+) sensitiv wie WT, (++) hypersensitiv)

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
1	YAL002w	VPS8	vacuolar sorting protein, 134 kD	13	+
2	YAL005c	SSA1	heat shock protein of HSP70 family, Zytosolic	12	+
3	YAL007c	ERP2	p24 protein involved in membrane trafficking	12	+
4	YAL014c	SYN8	hypothetical protein	11	+
5	YAL026c	DRS2	P-type ATPase reported to act as an aminophospholipid translocase (flippase)	6	-
6	YAL029c	MYO4	myosin heavy chain, unconventional (class V) isoform	12	+
7	YAL030w	SNC1	synaptic vesicle-associated membrane protein	11	+
8	YAL042w	ERV46	component of copii vesicles involved in transport between the ER and golgi complex	11	+
9	YAL048c		vacuolar aspartic protease	13	+
10	YAR002c-a	ERP1	p24 protein involved in membrane trafficking	13	+
11	YBL007c	SLA1	cytoskeleton assembly control protein	0	--
12	YBL017c	PEP1	vacuolar protein sorting/targeting protein	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
13	YBL047c	EDE1	EH domain protein involved in endocytosis	7	-
14	YBL063w	KIP1	kinesin-related protein	11	+
15	YBL078c	AUT7	essential for autophagy	12	+
16	YBL099w	ATP1	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit	13	+
17	YBL106c	SRO77	polarized exocytosis by regulating SNARE function	13	+
18	YBR021w	FUR4	Uracil permease	15	+
19	YBR039w	ATP3	F1F0-ATPase complex, F1 gamma subunit	24	++
20	YBR068c	BAP2	Broad-specificity amino-acid permease - inducible by most neutral amino acids	21	++
21	YBR069c	TAT1	Broad-specificity amino-acid permease	11	+
22	YBR097w	VPS15	ser/thr protein kinase	20	++
23	YBR105c	VID24	required for vacuolar import and degradation of Fbp1p	11	+
24	YBR127c	VMA2	H⁺-ATPase V1 domain 60 KD subunit, vacuolar	19	++
25	YBR131w	Ccz1	Calcium Caffeine Zinc sensitivity	17	++
26	YBR162w-a	YSY6	secretory pathway protein	11	+
27	YBR164c	ARL1	ADP-ribosylation factor	15	+
28	YBR169c	SSE2	Heat shock protein of the HSP70 family	11	+
29	YBR170c	NPL4	nuclear protein localization factor and ER translocation component	9	-

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
30	YBR171w	SEC66	ER protein-translocation complex subunit	5	-
31	YBR172c	SMY2	kinesin-related protein	11	+
32	YBR217w	APG12	Component of the autophagic system	14	+
33	YBR264c	YPT10	similarity to GTP-binding proteins	11	+
34	YBR283c	SSH1	Protein involved in co-translational pathway of protein transport	11	+
35	YBR286w	APE3	Aminopeptidase Y	14	+
36	YBR288c	APM3	AP-3 complex subunit, mu3 subunit, 55 KD	13	+
37	YBR294w	SUL1	Sulfate permease I	13	+
38	YBR298c	MAL31	Maltose permease	13	+
39	YCL008c	STP22	required for vacuolar targeting of temperature-sensitive plasma membrane proteins, Ste2p and Can1p	12	+
40	YCL038c	AUT4	breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole	11	+
41	YCL040w	GLK1	aldohexose specific glucokinase	12	+
42	YCR009c	RVS161	similarity to human amphiphysin and Rvs167p	11	+
43	YCR032w	BPH1	similarity to human beige-like protein and mouse lysosomal trafficking regulator	13	+
44	YCR067c	SED4	protein of the endoplasmic reticulum	13	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
45	YCR075c	ERS1	Protein similar to the human lysosomal CTNS cystine transporter mediating H ⁺ -driven cystine export from lysosomes - unknown function	13	+
46	YDL018c	ERP3	weak similarity to Dep1p	11	+
47	YDL077c	VAM6/VPS39	vacuolar carboxypeptidase Y	12	+
48	YDL107w	MSS2	COX2 pre-mRNA splicing factor	11	+
49	YDL128w	VCX1	Vacuolar Ca⁺⁺/H⁺ exchanger	10	-
50	YDL137w	ARF2	GTP-binding protein of the ARF family	11	±
51	YDL161w	ENT1	clathrin binding protein, required for endocytosis	11	+
52	YDL185w	TFP1	encodes 3 region protein which is self-spliced into TFP1p and PI-Scel	19	++
53	YDL192w	ARF1	small GTP-binding protein of the ARF family	9	-
54	YDL194w	SNF3	Sensor of low external Glukose concentrations	11	+
55	YDL198c	YHM1	Protein of the mitochondrial carrier family (MCF) - unknown function	13	+
56	YDL210w	UGA4	GABA permease - also involved in delta-aminolevulinate transport	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
57	YDL226c	GCS1	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein (ARF-GAP)	11	+
58	YDR027c	VPS54	subunit of VP51-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golgi	11	+
59	YDR046c	BAP3	Broad-specificity amino-acid permease - inducible by most neutral amino acids	11	+
60	YDR057w	YOS9	ER to golgi transport of GPI- anchored proteins	11	+
61	YDR108w	GSG1	sporulation specific protein	14	+
62	YDR117c	TMA64	similarity to mouse ligatin, a trafficking receptor for phosphoglycoproteins	11	+
63	YDR129c	SAC6	actin filament bundling protein, fimbrin	0	--
64	YDR136c	VPS61	involved in vacuolar protein sorting	13	+
65	YDR139c	RUB1		13	+
66	YDR142c	PEX7	peroxisomal import protein - peroxin	12	+
67	YDR153c	ENT5	epsin-related protein required for golgi-endosome traffic	11	+
68	YDR229w	IVY1	phospholipid-binding protein	12	+
69	YDR298c	ATP5	F1F0-ATPase complex, OSCP subunit	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
70	YDR320c	SWA2	clathrin-binding protein required for normal clathrin function and for uncoating of clathrin-coated vesicles	13	+
71	YDR323c	PEP7	vacuolar segregation protein	16	++
72	YDR335w	MSN5	multicopy supressor of snf1 mutation	6	-
73	YDR345c	HXT3	Low-affinity hexose facilitator	13	+
74	YDR372c	VPS74	similarity to hypothetical S. pombe protein	0	--
75	YDR384c	ATO3	ammonium export transporter	12	+
76	YDR388w	RVS167	reduced viability upon starvation protein	10	-
77	YDR395w	SXM1	putative beta-karyopherin	13	+
78	YDR400W	URH1	Uridine ribohydrolase	12	+
79	YDR424c	DYN2	dynein light chain 1, Zytosolic	11	+
80	YDR432w	NPL3	nucleolar protein	15	+
81	YDR456w	NHX1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger of the prevacuolar compartment - involved in salt tolerance	12	+
82	YDR470c	UGO1	outer membrane protein required for mitochondrial fusion	13	+
83	YDR481c	Pho8	alkaline Phosphatase	15	+
84	YDR484w	VPS52	ubunit of VP51-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golg	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
85	YDR488c	PAC11	required in the absence of Cin8p	11	+
86	YDR490c	Pkh1	ser/thr protein kinases	9	=
87	YDR497c	ITR1	Inositol permease	6	-
88	YDR508c	GNP1	Broad-specificity amino-acid permease	11	+
89	YEL006w	YEA6	similarity to peroxisomal membrane and mitochondrial carrier proteins	13	+
90	YEL027w	CUP5	H⁺-ATPase V0 domain 17 KD subunit, vacuolar	18	++
91	YEL031w	SPF1/ Cod1	P-type ATPase - unknown function	11	+
92	YEL051w	VMA8	H⁺-ATPsynthase V1 domain 32 KD subunit, vacuolar	18	++
93	YEL060c	Prb1	Proteinase B	12	+
94	YEL061c	CIN8	kinesin-related protein	14	+
95	YEL063c	CAN1	Arginine permease	12	+
96	YER017c	AFG3/YTA10	protease of the SEC18/CDC48/PAS1 family of ATPases (AAA)	14	+
97	YER019c-a	SBH2	ER protein-translocation complex subunit	14	+
98	YER031c	YPT31	GTP-binding protein of the rab family	10	-
99	YER039c	HVG1	strong similarity to vanadate resistance protein Gog5p	11	+
100	YER053c	PIC2	Vacuolar carrier protein	12	+
101	YER056c	FCY2	Purine/cytosine permease	14	+
102	YER110c	KAP123	RAN-binding protein	16	++

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
103	YER119c	AVT6	involved in amino acid efflux from the vacuole	11	+
104	YER144c	UBP5	ubiquitin-specific protease	14	+
105	YFL011w	HXT10	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity - unknown physiological function	11	+
106	YFL025c	BST1	negative regulator of COPII vesicle formation	9	-
107	YFL026w	STE2	pheromone alpha-factor receptor	11	+
108	YFL041w	FET5	multicopy oxidase	14	+
109	YFL050c	ALR2	Transporter of magnesium and other divalent cations	12	+
110	YFR019w	FAB1	phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	15	+
111	YFR045w	-	similarity to members of the mitochondrial carrier (MCF) family	13	+
112	YGL002w	ERP6	strong similarity to human gp25L2 protein	11	+
113	YGL005c	COG7	conserved oligomeric golgi complex	14	+
114	YGL006w	PMC1	Vacuolar P-type ATPase transporting Ca ⁺⁺ into the vacuole	11	+
115	YGL016w	KAP122	Member of the karyopherin-beta family, nuclear import	14	+
116	YGL051w	MST27	Multicopy suppressor of Sec Twenty-one	11	+
117	YGL054c	ERV14	ER-derived Vesicles	9	-
118	YGL077c	HNM1	Choline permease	12	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
119	YGL095c	VPS45	vacuolar protein sorting-associated protein	16	++
120	YGL104c	VPS73	similarity to Glukose transport proteins	11	+
121	YGL114w	-	weak similarity to permeases - unknown function	12	+
122	YGL156w	AMS1	alpha-Mannosidase	11	+
123	YGL167c	PMR1	Ca⁺⁺-transporting P-type ATPase located in Golgi	0	--
124	YGL180w	APG1	essential for autophagocytosis	12	+
125	YGL200c	EMP24	component of the COPII-coated vesicles, 24 kDa	12	+
126	YGL206c	CHC1	clathrin heavy chain	0	--
127	YGL210w	YPT32	small GTP-binding protein essential for Golgi function	12	+
128	YGL212w	VAM7	vacuolar morphogenesis protein	13	+
129	YGL212w	VAM7/VPS43	vacuolar morphogenesis protein	15	+
130	YGL216w	KIP3	kinesin-related protein required for nuclear migration	13	+
131	YGL223c	COG1	conserved oligomeric golgi complex	13	+
132	YGR020c	VMA7	H ⁺ -ATPase V1 domain 14 kDa subunit, vacuolar	11	+
133	YGR055w	MUP1	High affinity methionine permease	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
134	YGR057c	LST7	required for amino acid permease transport from the Golgi to the cell surface	12	+
135	YGR121c	MEP1	High-affinity ammonium permease	11	+
136	YGR131w	-	strong similarity to Nce2p	11	+
137	YGR166w	KRE11	beta-glucan synthesis-associated protein	5	-
138	YGR167w	CLC1	clathrin light chain	12	+
139	YGR241c	YAP1802	Yeast Adaptor Protein, member of AP180 protein family	13	+
140	YGR261c	APL6	AP-3 complex subunit, beta3-adaptin, 91 KD	13	+
141	YHL002w	HSE1	part of Vps27p Hse1p complex	13	+
142	YHL019c	APM2	involved in clathrin-independent transport processes	14	+
143	YHL031c	GOS1	SNARE protein of Golgi compartment	14	+
144	YHL036w	MUP3	Low-affinity methionine permease	14	+
145	YHR012w	VPS29	involved in vacuolar protein sorting	13	+
146	YHR028c	DAP2	dipeptidyl aminopeptidase B	13	+
147	YHR043c	DOG2	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase	12	+
148	YHR050w	SMF2	Transporter of divalent metal cations (manganese, copper, iron)	13	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
149	YHR064c	SSZ1	regulator protein involved in pleiotropic drug resistance	9	-
150	YHR092c	HXT4	Hexose facilitator of moderately low affinity	12	+
151	YHR094c	HXT1	Low-affinity hexose facilitator	11	+
152	YHR108w	GGA2	Arf-binding protein	13	+
153	YHR110w	ERP5	similarity to human gp25L2 protein	15	+
154	YHR123w	EPT1	sn-1,2-diacylglycerol ethanolamine- and cholinephosphotransferase	14	+
155	YHR127w	HSN1	hypothetical protein	11	+
156	YHR129c	ARP1	centractin	14	+
157	YHR135c	YCK1	casein kinase I isoform	12	+
158	YHR142w	CHS7	control of protein export from the ER (like chitin synthase III)	13	+
159	YHR161c	YAP1801	Yeast Adaptor Protein, member of AP180 protein family	12	+
160	YHR195w	NVJ1	part of nucleus-vacuole junctions	11	+
161	YIL005w	EPS1	disulfide-isomerase	12	+
162	YIL030c	SSM4/ DOA10	involved in mRNA turnover	12	+
163	YIL076w	SEC28	epsilon-COP coatomer subunit	11	+
164	YIL170w	HXT12	strong similarity to sugar transport proteins	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
165	YIR004w	DJP1	DnaJ-like protein involved specifically in peroxisomal protein import	10	-
166	YIR028w	DAL4	Allantoin permease	13	+
167	YJL004c	SYS1	multi copy suppressor of ypt6	13	+
168	YJL024c	APS3	AP-3 complex subunit, sigma3 subunit, 22 KD	11	+
169	YJL029c	VPS53	subunit of VP51-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golgi	11	+
170	YJL044c	GYP6	GTPase-activating protein	11	+
171	YJL093c	TOK1	Voltage-gated, outward-rectifying K⁺ channel protein of the plasma membrane	10	-
172	YJL099w	CHS6	chitin biosynthesis protein	11	+
173	YJL129c	TRK1	Potassium transporter I	11	+
174	YJL133w	MRS3	Protein of the mitochondrial carrier family (MCF) - unknown function	12	+
175	YJL154c	VPS35	protein-sorting protein, vacuolar	15	+
176	YJL172w	CPS1	CPS	12	+
177	YJL178c	ETF1	effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase	11	+
178	YJL192c	SOP4	facilitates ER export of the yeast plasma membrane [H ⁺]ATPase, Pma1	12	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
179	YJL214w	HXT8	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity - unknown physiological function	11	+
180	YJR001w	AVT1	required for the vacuolar uptake of large neutral amino acids	12	+
181	YJR005w	APL1	AP-2 complex subunit, beta2-adaptin, 78 KD	0	--
182	YJR031c	GEA1	GDP/GTP exchange factor for ARF	11	+
183	YJR040w	GEF1	Chloride channel of Golgi and endosomal compartments	11	+
184	YJR044c	VPS55	involved in late endosome to vacuole trafficking	11	+
185	YJR058c	APS2	AP-2 complex subunit, sigma2 subunit, 17 KD	0	--
186	YJR059w	PTK2	involved in polyamine uptake	14	+
187	YJR074w	MOG1	required for nuclear-protein import, GSP1-interacting	11	+
188	YJR077c	MIR1	Mitochondrial phosphate carrier - member of the mitochondrial carrier (MCF) family	11	+
189	YJR090c	GRR1	required for Glukose repression and for Glukose and cation transport	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
190	YJR095w	SFC1	Mitochondrial succinate-fumarate carrier - member of the mitochondrial carrier (MCF) family	11	+
191	YJR121w	ATP2	F1F0-ATPase complex, F1 beta subunit	0	--
192	YJR131w	MNS1	alpha1,2-mannosidase	13	
193	YJR152w	DAL5	Allantoate and ureidosuccinate permease	11	+
194	YKL002w	DID4	class E vacuolar-protein sorting and endocytosis factor	9	-
195	YKL016c	ATP7	F1F0-ATPase complex, FO D subunit	10	-
196	YKL041w	VPS24	endosomal Vps protein complex subunit	11	+
197	YKL079w	SMY1	kinesin-related protein	12	+
198	YKL080w	VMA5	H+-ATPase V1 domain 42 KD subunit, vacuolar	16	++
199	YKL103c	LAP4	Aminopeptidase I	14	+
200	YKL126w	YPK1	ser/thr-specific protein kinase	5	-
201	YKL129c	MYO3	myosin type I	12	+
202	YKL135c	APL2	AP-1 complex subunit, beta1-adaptin, 82 KD	12	+
203	YKL146w	AVT3	involved in amino acid efflux from the vacuole	11	+
204	YKL175w	ZRT3	Vacuolar zinc efflux protein	11	+
205	YKL179c	COY1	CASP Of Yeast	12	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
206	YKL188c	PXA2	Half-size ABC transporter required for import of long-chain fatty-acids into peroxisomes	11	+
207	YKL198c	PTK1	polyamine transport enhancing protein	12	+
208	YKL199c	YKT9	PTK1-YKT9 overlapping sequences may arise from a gene duplication event involving chromosomes X and XI	12	+
209	YKL206C	ADD66	Protein of unknown function involved in ER-associated protein degradation	11	+
210	YKL212w	SAC1	recessive suppressor of secretory defect	16	++
211	YKR014c	YPT52	GTP-binding protein of the rab family	12	+
212	YKR020w	VPS67	subunit of VP51-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golgi	13	+
213	YKR039w	GAP1	General amino acid permease	12	+
214	YKR052c	MRS4	Protein of the mitochondrial carrier family (MCF) - unknown function	15	+
215	YKR054c	DYN1	dynein heavy chain, Zytosolic	11	+
216	YKR093w	PTR2	Di- and tripeptide permease	11	+
217	YLL024c	SSA2	heat shock protein of HSP70 family, Zytosolic	9	-

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [nm]	Sensitivität
218	YLL043w	FPS1	Glycerol channel of the plasma membrane -also involved in arsenite and antimonite uptake (MIP family)	0	--
219	YLR018c	POM34	component of nuclear pore complex (nucleoporin)	13	+
220	YLR025w	SNF7	class E Vps protein	13	+
221	YLR081w	GAL2	Galactose permease	13	+
222	YLR083c	EMP70	endosomal protein	12	+
223	YLR119w	SRN2	suppressor of rna1-1 mutation	12	+
224	YLR148w	PEP3	vacuolar membrane protein	15	+
225	YLR170c	APS1	AP-1 complex subunit, sigma1 subunit, 18 KD	11	+
226	YLR207w	HRD3	Protein involved in degradation of Hmg2p	13	+
227	YLR240w	VPS34	phosphatidylinositol 3-kinase	19	++
228	YLR250w	SSP120	secretory protein	12	+
229	YLR262c	YPT6	GTP-binding protein of the rab family	13	+
230	YLR268w	SEC22	synaptobrevin (V-SNARE)	6	-
231	YLR292c	SEC72	ER protein-translocation complex subunit	13	+
232	YLR295c	ATP14	F1F0-ATPase complex, subunit h	13	+
233	YLR309c	IMH1	involved in vesicular transport	11	+
234	YLR337c	VRP1	verprolin	0	--

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
235	YLR348c	DIC1	Mitochondrial dicarboxylate carrier - member of the mitochondrial carrier (MCF) family	13	+
236	YLR370c	ARC18	subunit of the Arp2/3 complex	9	=
237	YLR380W	CSR1	Phosphatidylinositol transfer protein	12	+
238	YLR396c	VPS33	vacuolar sorting protein	11	+
239	YLR447c	VMA6	H⁺-ATPase V0 domain 36 KD subunit, vacuolar	22	++
240	YML001w	YPT7	GTP-binding protein of the RAB family	12	+
241	YML012w	ERV25	component of the COPII-coated vesicles, 25 Kda	11	+
242	YML042w	CAT2	carnitine O-acetyltransferase	12	+
243	YML062c	MFT1	mitochondrial fusion target protein	15	+
244	YML067c	ERV41	component of copii vesicles involved in transport between the ER and golgi complex	11	+
245	YML071c	COG8	conserved oligomeric golgi complex	11	+
246	YML097c	VPS9	vacuolar sorting protein	11	+
247	YML103c	NUP188	nuclear pore protein	11	+
248	YML111w	BUL2	ubiquitin-mediated protein degradation	10	-
249	YML123c	PHO84	Inorganic phosphate permease	12	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
250	YMR011w	HXT2	Hexose facilitator of moderately low affinity for Glukose	11	+
251	YMR017w	SPO20	Dbf2p interacting protein	13	+
252	YMR054w	STV1	H ⁺ -ATPase V0 domain 102 KD subunit, not vacuolar	13	+
253	YMR058w	FET3	cell surface ferroxidase, high affinity	15	+
254	YMR089c	YTA12	Protease of the SEC18/CDC48/PAS1 family of ATPases (AAA)	12	+
255	YMR109w	MYO5	myosin I	9	-
256	YMR166c	-	similarity to members of the mitochondrial carrier protein family	11	+
257	YMR183c	SSO2	syntaxin (T-SNARE)	12	+
258	YMR184W			13	+
259	YMR198w	CIK1	spindle pole body associated protein	13	+
260	YMR231w	PEP5	vacuolar biogenesis protein	18	++
261	YMR243c	ZRC1	Vacuolar transporter of zinc (and possibly other metals)	12	+
262	YMR264w	CUE1	involved in ubiquitination and degradation at the ER surface	12	+
263	YMR297w	PRC1	carboxypeptidase y, serine-type protease	12	+
264	YMR319c	FET4	Low affinity iron and copper transporter	12	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
265	YNL003c	PET8	Protein of the mitochondrial carrier family (MCF) - unknown function	11	+
266	YNL041c	COG6	conserved oligomeric golgi complex	11	+
267	YNL044w	YIP3	protein of unknown function	11	+
268	YNL051w	COG5	conserved oligomeric golgi complex	14	+
269	YNL055c	POR1	Voltage dependent anion-selective channel (YVDAC1) of the mitochondrial outer membrane	12	+
270	YNL070w	TOM7	mitochondrial outer membrane import receptor subunit, 7 kD	11	+
271	YNL079c	TPM1	tropomyosin 1	12	+
272	YNL083w	SAL1	similarity to members of the mitochondrial carrier (MCF) family	11	+
273	YNL084c	END3	required for endocytosis and cytoskeletal organization	0	--
274	YNL093w	YPT53	GTP-binding protein of the RAB family (RAS superfamily)	11	+
275	YNL101w	AVT4	involved in amino acid efflux from the vacuole	10	-
276	YNL121c	TOM70	mitochondrial outer membrane specialized import receptor	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
277	YNL142w	MEP2	High affinity ammonium permease - proposed role also as ammonium sensor involved in pseudohyphal growth	9	-
278	YNL154c	YCK2	casein kinase I isoform	12	+
279	YNL183c	NPR1	ser/thr protein kinase	17	++
280	YNL243w	END4/ SLA2	cytoskeleton assembly control protein	0	--
281	YNL268w	LYP1	Lysine permease	16	++
282	YNL270c	ALP1	Protein of the amino-acid permease family - unknown biological function	12	+
283	YNL304w	YPT11	similarity to Ypt1p and rab GTP-binding proteins	11	+
284	YNL318c	HXT14	Protein of the sugar transporter superfamily - able to sustain slow growth on galactose	11	+
285	YNL325c	FIG4	weak similarity to inositol phosphatase	12	+
286	YNR006w	VPS27	vacuolar protein sorting-associated protein	9	-
287	YNR007c	AUT1	essential for autophagocytosis	11	+
288	YNR049c	MSO1	secretion protein, multicopy suppressor of sec1	11	+
289	YNR072w	HXT17	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity - unknown physiological function	13	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
290	YOL013c	HRD1	involved in degradation of Hmg2p	11	+
291	YOL018c	TLG2	member of the syntaxin family of t-SNAREs	14	+
292	YOL020w	TAT2	Broad-specificity amino-acid permease - inducible by most neutral amino acids	13	+
293	YOL044w	PEX15	required for peroxisome assembly - peroxin	14	+
294	YOL062c	APM4	AP-2 complex subunit, mu2 subunit, 55 KD	0	--
295	YOL082w	CVT19	similarity to YOL083w	12	+
296	YOL103w	ITR2	Inositol permease	15	+
297	YOL122c	SMF1	Manganese transporter of the plasma membrane	14	+
298	YOR034c	AKR2	involved in constitutive endocytosis of Ste3p	15	+
299	YOR035c	SHE4	required for mother cell-specific gene expression	0	--
300	YOR036w	PEP12	syntaxin (T-SNARE), vacuolar	13	+
301	YOR037w	CYC2	cytochrome-c mitochondrial import factor	11	+
302	YOR045w	TOM6	mitochondrial outer membrane import receptor subunit, 6 kD	14	+
303	YOR070c	GYP1	GTPase activating protein for Ypt1p and Sec4p	13	+
304	YOR087w	YVC1	vacuolar cation channel	13	+
305	YOR089c	VPS21	GTP-binding protein	14	+
306	YOR094w	ARF3	ADP-ribosylation factor 3	11	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
307	YOR100c	CRC1	Mitochondrial carnitine carrier - member of the mitochondrial carrier (MCF) family	13	+
308	YOR106w	VAM3	syntaxin (t-SNARE)	13	+
309	YOR106w	Vam3	syntaxin (t-SNARE)	15	+
310	YOR115c	TRS33	TRAPP subunit of 33 kDa involved in targeting and fusion of ER to golgi transport vesicles	9	-
311	YOR130c	ORT1	Mitochondrial ornithine carrier - member of the mitochondrial carrier (MCF) family	14	+
312	YOR185c	GSP2	GTP-binding protein of the RAS superfamily	13	+
313	YOR216c	RUD3	suppressor of uso1-1 transport defect	11	+
314	YOR270c	VPH1	H⁺-ATPase V0 domain 95K subunit, vacuolar	16	++
315	YOR307c	SLY41	Putative transporter of the triose phosphate translocator family - unknown function	11	+
316	YOR316c	COT1	Vacuolar zinc (and possibly other metals) transporter	13	+
317	YOR327c	SNC2	synaptobrevin (v-SNARE) homolog present on post-Golgi vesicles	11	+
318	YOR332w	VMA4	H ⁺ -ATPase V1 domain 27 KD subunit, vacuolar	13	+
319	YOR348c	PUT4	Proline permease	14	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
320	YPL019c	VTC3	strong similarity to YFL004w, similarity to YJL012c	9	-
321	YPL045w	VPS16	vacuolar sorting protein	12	+
322	YPL051w	ARL3	ADP-ribosylation factor-like protein, member of the arf-sar family in the ras superfamily	14	+
323	YPL065w	VPS28	involved in vacuolar traffic	12	+
324	YPL078c	ATP4	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B	15	+
325	YPL120w	VPS30	involved in vacuolare protein sorting and autophagy	12	+
326	YPL125w	KAP120	nuclear transport factor, member of karyopherin-beta family	12	+
327	YPL145c	KES1	involved in ergosterol biosynthesis	11	+
328	YPL147w	PXA1	^Half-size^ ABC transporter required for import of long-chain fatty-acids into peroxisomes	13	+
329	YPL155c	KIP2	kinesin-related protein	12	+
330	YPL174c	NIP100	component of the dynactin complex	12	+
331	YPL195w	APL5	AP-3 complex subunit, gamma-adaptin, 107 KD	13	+
332	YPL232w	SSO1	syntaxin-related protein	13	+
333	YPL234c	TFP3	H⁺-ATPase V0 domain 17 KD subunit, vacuolar	21	++

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
334	YPL259c	APM1	AP-1 complex subunit, mu1 subunit, 54 KD	11	+
335	YPL271w	ATP15	F1F0-ATPase complex, F1 epsilon subunit	12	+
336	YPR009w	SUT2	similarity to sterol uptake protein Sut1p	10	+
337	YPR011c	-	similarity to members of the mitochondrial carrier (MCF) family	13	+
338	YPR017c	DSS4	GDP/GTP exchange factor for Sec4p	11	+
339	YPR024w	YME1	protease of the SEC18/CDC48/PAS1 family of ATPases (AAA)	11	+
340	YPR028w	YOP1	Ypt-interacting protein	10	-
341	YPR029c	APL4	AP-1 complex subunit, gamma-adaptin, 94 KD	11	+
342	YPR032w	SRO7	polarized exocytosis by regulating SNARE function	14	+
343	YPR036w	VMA13	H⁺-ATPase V1 domain 54 KD subunit, vacuolar	20	++
344	YPR037c	ERV2	Flavin-linked sulfhydryl oxidase	11	+
345	YPR058w	YMC1	Protein of the mitochondrial carrier family (MCF) - unknown function	11	+
346	YPR095c	SYT1	guanine nucleotide exchange factor, contains a conserved Sec7p-domain	11	+
347	YPR124w	CTR1	Plasma membrane copper transport protein	12	+

	ORF	Deletiertes Gen	Funktion des Genproduktes	Ø [mm]	Sensitivität
348	YPR129w	SCD6	suppressor of clathrin deficiency	11	+
349	YPR141c	KAR3	kinesin-related protein	11	+
350	YPR149w	NCE102	involved in non-classical protein export pathway	15	+
351	YPR173c	VPS4	vacuolar sorting protein	13	+
352	YPR185w	APG13	protein required for the autophagic process	12	+

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, Dezember 2007

(Susanne Stephanie Heiligenstein)

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt, gilt mein herzlichster Dank für die Anregung zu dieser Arbeit, sein Interesse und die stete Diskussionsbereitschaft, die zu vielen Lösungen maßgeblich beigetragen haben sowie die Betreuung, die er mir über die gesamten Jahre zuteil werden ließ.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Giffhorn danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Randy Schekman, Herrn Prof. Howard Riezman, Frau Prof. Linda Hicke, Herrn Prof. Jeffrey Brodsky, Herrn Prof. Mark Hochstrasser, Herrn Prof. Hugh Pelham, Herrn Prof. Jakob Winther, Herrn Prof. Tom Rapoport und Herrn Prof. Elmar Heinzle danke ich für die freundliche Bereitstellung von Hefestämmen und Plasmiden.

Dr. Miriam Steimer und Christina Ries danke ich für eine ausgesprochen gute und harmonische Zusammenarbeit während der Anfertigung ihrer Diplomarbeiten.

Frau Andrea Karrenbauer, Frau Beate Schmitt und Frau Sabine Prediger möchte ich besonders für die technische Unterstützung in der experimentellen Phase meiner Arbeit danken.

Björn Diehl und Dr. Christian Zimmer danke ich für die große Geduld bei der Lösung computertechnischer Probleme.

Dr. Jochen Reiter, Dr. Frank Breinig, Marc Lind, Dr. Frank Powilleit und allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für einen unverwechselbar schönen Laboralltag.

Natalia Jimenez-Becker, Dr. Katrin Eisfeld, Antje Eiden-Plach, Christina Ries, Dr. Tanja Sendzik, Dr. Diane Drescher-Petersen, Dr. Jenny Spindler, Dr. Miriam Steimer und Dr. Tatjana Zagorc danke ich für die jahrelange besondere Freundschaft, die uns verbindet.

Mein innigster Dank gilt meiner Familie, meiner Tochter Lilli, meinem Mann Patrice, meinen Eltern Gisela und Hans-Günther sowie meiner Tante Lieselotte für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch, die schließlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Name: Susanne Heiligenstein, geb. Leis
Geburtsdatum: 11.04.1974
Geburtsort: Saarbrücken
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule St. Annual, Saarbrücken
1984-1993 Gymnasium am Schloß, Saarbrücken
Abitur-Abschlußnote Gut (2,2)

wissenschaftlicher Werdegang:

1993-1994 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Universität des Saarlandes
1994-2000 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes
Titel der Diplomarbeit: Identifizierung zellulärer Interaktionspartner des viralen K28-Toxins der Hefe durch Transposon-Mutagenese
Note: sehr gut
2001-2005 Doktorandin am Institut der angewandten Molekularbiologie der Universität des Saarlandes
Titel der Dissertation: Endozytose, Retrotranslokation und Ubiquitinierung des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*
2005-2006 Hochschulassistentin im Projekt Mikroalge der Bioverfahrenstechnik an der Hochschule für Technik und Wirtschaft des Saarlandes
seit Januar 2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Homburg/Saar