

**Untersuchungen zum  
zellulären Mechanismus der  
ER/Cytosol-Retrotranslokation  
einer cytotoxischen  $\alpha$ -Variante des  
viralen A/B-Toxins K28 der Hefe**

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

Diplom-Biologin Mareike Kelkel

Saarbrücken 2009

Tag des Kolloquiums:	20. Mai 2009
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Stefan Diebels
Prüfungsausschuss:	
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Manfred J. Schmitt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Richard Zimmermann
Vorsitzender:	Prof. Dr. Volkhard Helms Dr. Gert-Wieland Koring

**„Wer glaubt etwas zu sein,  
hat aufgehört etwas zu werden.“**

Sokrates

Für meine stolzen Eltern und meinen geliebten Ehemann.

## Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Manuskript in Vorbereitung:

**Kelkel, M. et al. (2009):** ER-to-cytosol retrotranslocation mechanistically differs in the  $\alpha/\beta$ -heterodimeric K28 toxin and its cytotoxic  $\alpha$ -variant after expression in the ER lumen.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....

Abstract .....

### TEIL A

#### I Einleitung..... 1

##### 1. Killertoxine und das Killerphänomen der Hefe

*Saccharomyces cerevisiae*..... 1

1.1 Ausbildung des Killerphänotyps bei *Saccharomyces cerevisiae* ...2

1.2 Prozessierung des Toxinvorläufers und Toxinsekretion .....5

1.3 Internalisierung und retrograder Transport.....9

1.4 Toxizität des Killertoxins K28..... 11

1.5 Immunität ..... 15

2. A/B-Toxine und ERAD..... 17

3. Ziele und Fragestellungen der Arbeit.....23

#### II Material und Methoden ..... 24

1. Verwendete Stämme und Plasmide ..... 24

1.1 Bakterienstämme ..... 24

1.2 Hefestämme ..... 25

2. Kultivierung..... 29

2.1 Kulturbedingungen ..... 29

2.2 Kryokulturen ..... 29

2.3 Nährmedien ..... 30

3. Molekularbiologische Methoden ..... 34

3.1 Plasmide ..... 34

3.2 Oligonukleotide ..... 40

3.2.1 Primer ..... 40

3.3 DNA-Isolierungsmethoden ..... 42

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* ..... 42

3.3.1.1 Alkalische Lyse ..... 42

3.3.1.2 Plasmid-Mini-Kit ..... 43

3.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen ..... 44

3.4 Transformationstechniken .....	44
3.4.1 Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	44
3.4.2 Lithiumacetat-Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	45
3.5 Restriktion von Plasmid-DNA .....	46
3.6 Agarosegelelektrophorese .....	47
3.7 Ligation .....	48
3.8 PCR („Polymerase chain reaction“) .....	49
3.8.1 Standard-PCR .....	50
3.8.2 SOE-PCR .....	51
3.9 TOPO-Klonierung .....	52
3.10 Sequenzierung .....	53
3.11 <i>In vitro</i> Transkription .....	53
4. Proteinbiochemische Methoden .....	55
4.1 Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration .....	55
4.1.1 Bradford-Test .....	55
4.1.2 BCA-Test .....	56
4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	56
4.3 Western Blot .....	59
4.3.1 „Semi-Dry“-Blotting .....	59
4.3.2 Immunodetektion .....	60
4.3.2.1 Colorimetrischer Nachweis .....	61
4.3.2.2 Detektion mittels Chemilumineszenz .....	62
4.3.2.3 „Stripping“ und „Reprobing“ .....	62
4.4 <i>In vitro</i> Translation [ <sup>35</sup> S]-markierter Proteine .....	63
4.5 „Pulse“-Experiment .....	64
4.6 Immunpräzipitation .....	65
4.7 Zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese .....	68
4.7.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung .....	70
4.7.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE .....	72
4.8 DIGE .....	72
4.9 Coomassie-Färbung .....	74
4.10 „In-Gel“-Trypsinverdau .....	75
4.11 MALDI ToF/ToF-Analyse .....	75
5. Hefespezifische Methoden .....	81

5.1 Zellzahlbestimmung .....	81
5.1.1 Gesamtzellzahl .....	81
5.1.2 Optische Dichte.....	81
5.2 Assay zur Quantifizierung der <i>in vivo</i> Toxizität von K28α.....	81
5.3 Zellaufschluss von Hefen .....	82
5.3.1 Glasperlen-Aufschluss.....	82
5.3.2 S80-Schnellaufschluss.....	82
5.4 Sphäroplastierung .....	83
5.5 Zellfraktionierung.....	84
5.6 Herstellung von Toxinkonzentrat .....	86
5.7 Agardiffusionstest .....	87
6. Material.....	88
6.1 Antikörper.....	88
6.2 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	89
<b>III Ergebnisse.....</b>	<b>91</b>
1. Konstruktion verschiedener K28α Varianten zur Aufklärung des intrazellulären Toxintransportes in sensitiven Hefen .....	92
2. Nachweis der <i>in vivo</i> Cytotoxizität der hergestellten K28α-Derivate nach Expression in Hefe .....	95
3. Toxin-Eintritt in das ER ist Voraussetzung für die <i>in vivo</i> Toxizität von K28α.....	97
3.1 Die <i>in vivo</i> Expression von K28α-Varianten mit N-terminalem Sekretionssignal verursacht einen Selbstkillerphänotyp .....	97
4. Nachweis der toxischen α-Untereinheit im Zellysate sensitiver Hefen nach radioaktiver Markierung („Pulse“) .....	98
5. Untersuchungen zum intrazellulären Toxintransport von K28α .....	101
5.1 Mutantentests zum Nachweis des ER-Imports einer intrazellulär exprimierten K28α-Variante mit Signalsequenz .....	101
5.2 Untersuchung zur Beteiligung cytosolischer Chaperone am posttranslationalen ER-Import von K28α .....	104
5.3 Einfluss des Signalpeptidase-Komplexes auf die Toxizität von K28α .....	106
5.4 Trypsinverdau zum Nachweis einer möglichen Konformationsänderung der toxischen α-Untereinheit im Sekretionsweg .....	107
5.5 Untersuchungen zum Nachweis des ER-Golgi-Transportes der K28α-Untereinheit.....	111

5.5.1 COPII-Vesikel vermitteln den Transport von K28 $\alpha$ vom ER zum Golgi-Apparat.....	111
5.5.2 Untersuchungen zum Nachweis der Kex1p- und Kex2p-Prozessierung im <i>trans</i> -Golgi-Kompartiment .....	114
5.5.2.1 Herstellung getaggtter K28 $\alpha$ -Varianten zum Nachweis im Western Blot.....	115
5.5.2.2 Nachweis der Toxinaktivität getaggtter K28 $\alpha$ -Derivate ...	117
5.5.2.3 Nachweis der Kex2p-Prozessierung mittels Western Blot Analyse .....	118
5.5.2.4 Bedeutung Kex1p/Kex2p-Prozessierung von K28 $\alpha$ für dessen <i>in vivo</i> Toxizität .....	124
5.5.2.5 Untersuchungen zur Rolle des $\alpha$ -C-terminalen Arginin-Restes für Kex1p-Prozessierung und <i>in vivo</i> Toxizität von K28 $\alpha$ .....	125
6. Betrachtung der K28 $\alpha$ -Retrotranslokation .....	128
6.1 Untersuchungen zum Rücktransport von K28 $\alpha$ vom späten <i>trans</i> -Golgi zum ER .....	128
6.1.1 Phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit Defekten in der COPI-Vesikelbildung .....	128
6.1.2 Einfluss eines C-terminalen ER-Retentionssignals auf die Toxizität von K28 $\alpha$ .....	129
6.1.3 Untersuchungen zur Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten am ER-Export von K28 $\alpha$ .....	132
6.1.3.1 Einfluss des HRD1-Komplexes .....	133
6.1.3.2 Einfluss des DOA10-Komplexes .....	137
6.2 Untersuchungen zur Bedeutung des Ubiquitin/Proteasom-Systems für die Retrotranslokation von K28 $\alpha$ .....	138
6.2.1 Einfluss des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc4p .....	139
6.2.2 Einfluss des E4 Enzyms Ufd2p .....	140
6.2.3 Untersuchungen zur Beteiligung des CDC48-Komplexes.....	141
6.2.4 Untersuchungen zur Bedeutung der ubiquitinbindenden Proteine Rad23p und Dsk2p .....	142
6.2.5 Untersuchungen zur Ubiquitinierung der K28 $\alpha$ -Untereinheit in einer wildtypischen und einer Lysin-freien Variante nach intrazellulärer Expression von SS-pro- $\alpha^R$ .....	143
6.2.5.1 Einfluss der Lysinreste in K28 $\alpha$ auf die <i>in vivo</i> Toxizität.	143

6.2.6 Analyse der K28 $\alpha$ -Toxizität nach gleichzeitiger Überexpression einer mutierten Ubiquitinform mit Defekt in der Bildung von Polyubiquitinketten .....	145
6.2.7 Phänotypische Charakterisierung einer Deletionsmutante mit Defekt im deubiquitinierenden Enzym Doa4p .....	146
6.2.8 Immunpräzipitation zum direkten Nachweis einer Ubiquitinierung von K28 $\alpha$ .....	148
6.3 Einfluss cytosolischer und ER-luminaler Chaperone auf die Retrotranslokation von K28 $\alpha$ .....	149
7. Bedeutung der UPR für die Toxizität von K28 $\alpha$ .....	157
8. Einfluss der Ca <sup>2+</sup> -Homöostase .....	159
9. Proteomanalyse sensitiver Hefen nach K28-Behandlung .....	164
9.1 Vorversuche zur Abtötung einer sensitiven Hefe .....	164
9.2 Abtötungskinetik von <i>S. cerevisiae</i> TM230.....	165
9.3 Testgele zur Optimierung der Proteinauftrennung .....	167
9.4 Auswertung der zweidimensionalen DIGE-Gele .....	167
9.5 Proteinidentifizierung mittels MALDI-ToF/ToF MS/MS und Datenbankabgleich .....	169
<b>IV Diskussion .....</b>	<b>173</b>
Aufklärung des intrazellulären Transportweges von K28 $\alpha$ und Nachweis möglicher posttranslationaler K28 $\alpha$ -Modifikationen .....	175
Retrotranslokation: alternative Wege ins Cytosol? .....	186
Beteiligung des ERAD-Weges .....	186
Hinweise auf Ubiquitinierung der $\alpha$ -Untereinheit.....	194
Vergleich der Retrotranslokation des $\alpha/\beta$ -heterodimeren K28-Toxins und der <i>in vivo</i> exprimierten $\alpha$ -Untereinheit – zwei Modellvorschläge .....	202
1) ER-Cytosol-Dislokation des reifen K28-Toxins $\alpha/\beta^{\text{HDEL}}$ .....	202
2) Retrotranslokation von K28 nach Expression im ER .....	204
Einfluss der UPR auf die Toxizität von K28 $\alpha$ .....	207
Die Rolle des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc4p.....	211
Einfluss von Calcium auf die K28-Toxizität.....	213
Proteomanalyse einer K28-behandelten Hefe.....	216
<b>V Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>223</b>
<b>VI Literaturverzeichnis .....</b>	<b>227</b>

**TEIL B**

<b>I</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>263</b>
<b>II</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>266</b>
1.	Herstellung eines K28-KDEL-FLAG-(His) <sub>6</sub> -Toxinkonzentrates .....	266
1.1	Primer .....	266
1.2	PCR-Amplifizierung .....	266
1.3	<i>K. lactis</i> -Transformation .....	267
1.4	Herstellung des Toxinkonzentrates .....	268
1.5	Affinitätschromatografische Reinigung des His-getaggen K28-Toxins.....	269
2.	Silberfärbung von SDS-Gelen .....	270
3.	Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen .....	271
4.	Messung der Proteinbiosynthese .....	272
5.	Toxizitäts-Assay: DNA-Synthese Messung .....	273
6.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	275
7.	Mikroinjektions-Experimente .....	276
8.	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	277
<b>III</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>278</b>
1.	Herstellung eines K28-Toxinkonzentrates in <i>K. lactis</i> .....	278
2.	Bestimmung geeigneter Versuchsbedingungen .....	282
2.1	Einfluss von pH und Temperatur auf HeLa-Zellen.....	282
2.2	Bestimmung der optimalen Toxinkonzentration.....	284
3.	Untersuchungen zur Toxizität von K28-KDEL auf verschiedene Zelllinien .....	287
4.	Fehlersuche: worauf beruht die Toxizität des toxinfreien <i>K. lactis</i> Überstandes? .....	290
5.	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis einer Toxinbindung/ -internalisierung .....	292
6.	Mikroinjektions-Experimente.....	296
<b>IV</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>298</b>
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>307</b>
	Erklärung .....	308
	Danksagung .....	309
	Lebenslauf.....	312

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	“Anaphase promoting complex”
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BiFC	“bimolecular fluorescence complementation”
bp	Basenpaare
BVA	“Biological variation analysis”
bZIP	basischer Leucin-Zipper
Cap	Capsid
Cap/Pol	Capsid/RNA-abhängige RNA-Polymerase
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
CHC	„Clathrin heavy chain“
CPY	Carboxypeptidase der Hefe
CPY*	mutierte Variante der Carboxypeptidase
CT	Cholera Toxin
C-Terminus	Carboxyterminus am Protein
Cy	“cyanidine”
d/o	„dop out“
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIA	“Differential in-gel analysis”
DIGE	Differential in Gel Electrophoresis
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DT	Diphtherie Toxin

---

DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierungsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ExoA	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A
FBS	„Fetal bovine serum“
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GLB	„Gel loading buffer“
GTE	Glukose-Tris-EDTA
GZZ	Gesamtzellzahl
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOG	„high osmolarity glycerol“
HRP	„horse raddish peroxidase“
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	isoelektrische Fokussierung
IF	indirekte Immunfluoreszenz
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kbp	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LB	„Luria Bertani Broth“
LiAc	Lithiumacetat
LSM	„Laser scanning microscope“
LZZ	Lebendzellzahl
MALDI-MS	“Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry”
MBA	Methylenblauagar
MF	Sekretionssignal des $\alpha$ -„mating“ Faktors
mRNA	“messenger” RNA
NBT	4-Nitro-blau-tetrazolium-chlorid
N-Terminus	Aminoterminus am Protein
OD	Optische Dichte
ORF	„Open reading frame“
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
paF	Pro- $\alpha$ -Faktor

PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Polyethylenglykol
pl	isoelektrischer Punkt
PI	Protease-Inhibitoren
PMKT	<i>Pichia membranifaciens</i> Killertoxin
pptox	Präprotoxin
PT	Pertussis Toxin
ptox	Protoxin
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RNase	Ribonuklease
ROS	„reactive oxygen species“
RT	Raumtemperatur
SC	„Synthetic Complete“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHsp	“small heat shock protein”
SLT	“Shiga-like” Toxin
SOE-PCR	„Splicing by overlapping extension“ PCR
ss	„single stranded“
SS	Signalsequenz
Stx	Shiga Toxin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	„Tris-buffered saline“
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
ToF	“time of flight”
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	Über Nacht
UE	Untereinheit
Unit	Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	„Unfolded protein response“
UPRE	“unfolded protein-response element”

UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“
VLP	„Virus like particle“
WB	Western Blot
w/o	„without“
w/v	„weight per volume“
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
YCB	„Yeast carbon base“
YEPD	„Yeast extract/peptone/dextrose“
YNB	„Yeast nitrogen base“

## Abstract

K28, a viral A/B toxin produced by killer strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, kills sensitive yeasts in a receptor mediated process by inducing a cell cycle arrest. After endocytotic uptake the toxin passes the secretory pathway in reverse via Golgi and ER. In this study, toxin retrotranslocation from the ER into the cytosol has been investigated in detail by regulated expression of a lethal K28 $\alpha$  variant in the ER of selected deletion mutants. By this means it became evident that K28 $\alpha$  is packaged into COPII vesicles and transported to the Golgi by the help of Erv29p and Bst1p which normally recruit luminal ERAD substrates. Within a late Golgi removal of the pro-region by endopeptidase Kex2p cleavage is crucial for the *in vivo* toxicity of K28 $\alpha$ . In contrast to exogenously applied  $\alpha/\beta$  toxin, K28 $\alpha$  reaches the cytosol by abusing components of the ER quality control pathway ERAD. Sensitivity assays further indicated that HRD1 (in contrast to CDC48) complex components play a central role in K28 $\alpha$  *in vivo* toxicity. Preventing polyubiquitination of K28 $\alpha$  either by substitution of all internal lysine residues or by simultaneous overexpression of mutant ubiquitin, unable to form polyubiquitin chains, severely impaired *in vivo* toxicity. Thus, ubiquitination of K28 $\alpha$  seems to be essential for its retrotranslocation, although a direct biochemical proof is still missing.

Das virale A/B-Toxin K28 aus *Saccharomyces cerevisiae* tötet sensitive Hefen in einem rezeptorvermittelten Prozess durch Induktion eines Zellzyklusarrestes. Nach endozytotischer Internalisierung durchläuft das Toxin den Sekretionsweg retrograd über Golgi und ER. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation von K28 im Detail untersucht. Durch die Expression einer letalen K28 $\alpha$ -Variante im ER-Lumen ausgewählter Deletionsmutanten konnte nachgewiesen werden, dass K28 $\alpha$  nach Eintritt in den Sekretionsweg mit Hilfe von Erv29p und Bst1p in COPII-Vesikel verpackt und zum Golgi transportiert wird, wo die pro-Region durch die Aktivität der Endoprotease Kex2p entfernt wird. Dieser Schritt ist zwingend notwendig für die *in vivo* Toxizität von  $\alpha$ . Im Gegensatz zu exogen appliziertem  $\alpha/\beta$ -Toxin nutzt K28 $\alpha$  den zellulären ERAD-Qualitätskontrollmechanismus, um aus dem ER in das Cytosol zu gelangen. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion des HRD1-Komplexes (im Unterschied zu CDC48) von essenzieller Bedeutung für die Toxizität von  $\alpha$  ist. Wurde eine Polyubiquitinierung von K28 $\alpha$  durch Austausch der internen Lysinreste verhindert oder eine Ubiquitinmutante, die keine Polyubiquitinketten mehr bilden kann, simultan überexprimiert, so kam es in beiden Fällen zu einem Verlust der Toxizität. Die Ubiquitinierung von K28 $\alpha$  scheint somit für die Toxin-Retrotranslokation wichtig zu sein; ein direkter biochemischer Nachweis hierfür konnte bislang jedoch noch nicht erbracht werden.

## I Einleitung

### 1. Killertoxine und das Killerphänomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Neben ihrer wirtschaftlichen und kulturellen Bedeutung bei der Herstellung von Brot und alkoholischen Getränken ist die Hefe heutzutage aus der Wissenschaft nicht mehr wegzudenken. In der modernen Zell- und Molekularbiologie spielt vor allem die Bäckerhefe *S. cerevisiae* eine große Rolle. Wichtige Erkenntnisse zu zellulären Abläufen verdankt die Wissenschaft diesem Modellorganismus. Vor allem die Regulation des Zellzyklus, die DNA-Replikation, Rekombination, Zellteilung sowie Stoffwechselwege, aber auch intrazelluläre Transportwege, wie der Weg der Proteinsekretion oder die Endozytosemaschinerie, konnten durch Untersuchungen an Hefe aufgeklärt werden. Aufgrund großer Homologien der Hefegene zum menschlichen Genom sind diese Erkenntnisse weitgehend auf höhere Eukaryoten übertragbar (Botstein *et al.* 1997). Die Hefe eignet sich zudem als Modellorganismus, weil sie den GRAS-Status („Generally Regarded As Safe“) erfüllt, einfach zu kultivieren ist und aufgrund des haploiden Genoms sowie der Fähigkeit zur homologen Rekombination leicht genetisch manipulierbar ist (Sherman, 2002).

Im Jahre 1963 entdeckten Bevan und Makower einen *Saccharomyces cerevisiae* Stamm, der antibiotische Fähigkeiten aufwies. Sie konnten zeigen, dass die isolierte Hefe ein niedermolekulares Proteintoxin sezerniert, das in der Lage ist, sensitive Zellen derselben oder verwandter Hefegattungen ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zu töten (Bevan und Makower, 1963). Die sogenannten Killerstämme selbst sind dabei immun gegen ihr eigenes Toxin, bleiben aber anfällig für Toxine, die von anderen Killerhefen produziert werden (Schmitt und Tipper, 1990; Breinig *et al.*, 2006). Dieser Killerphänotyp, welcher sich

Toxinproduktion und funktionelle Immunität auszeichnet, ist bei Hefen weitverbreitet und wurde sowohl in natürlichen Hefeisolaten wie auch in Labor-Stammsammlungen identifiziert. Kurz nach der Entdeckung viraler Killersysteme in *Saccharomyces cerevisiae* und *Ustilago maydis* wurden Killerstämme auch in den Gattungen *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Torulopsis*, *Williopsis* und *Zygosaccharomyces* beschrieben (Tao *et al.*, 1990; Sawant *et al.*, 1989; Radler *et al.*, 1990; Radler *et al.*, 1993). Bereits 1978 klassifizierten Young und Yagiu 20 Killerhefen verschiedener Gattungen und ordneten sie 13 Klassen zu (Young und Yagiu, 1978). Starmer und Mitarbeiter (1987) beschrieben die ökologische Rolle von Killerhefen in natürlichen Hefemischkulturen. So konnten sie anhand der Verteilung der Hefe-Habitate zeigen, dass die toxinbildende Hefe *Pichia kluyveri* das Auftreten der sensitiven Hefe *Cryptococcus cereanus* in Früchten eingrenzt. Allgemein besitzen die meisten Lebensgemeinschaften nur eine Killerspezies und sichern damit ihr Überleben im Wettstreit um begrenzt verfügbare Nährstoffe.

### 1.1 Ausbildung des Killerphänotyps bei *Saccharomyces cerevisiae*

Während die genetische Grundlage des Killerphänotyps bei *Kluyveromyces lactis* auf die Anwesenheit zweier linearer dsDNA-Plasmide zurückzuführen ist (Gunge, 1986), basieren die Killereigenschaften anderer Killerstämme entweder auf doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder sie sind chromosomal kodiert. Bei *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* und der Bäckerhefe beruht die Ausprägung dieses Phänomens auf der Anwesenheit cytoplasmatisch vererbter dsRNA-Viren (Wickner, 1996; Schmitt und Neuhausen, 1994). Wie die meisten Mykoviren sind auch die Killerviren in *S. cerevisiae* nicht infektiös und vermehren sich scheinbar ohne Nachteil für die einzelne Zelle, weshalb sie auch als kryptische Viren oder „Virus Like Particles“ (VLPs) bezeichnet werden. Im Gegensatz

zum horizontalen Transfer der meisten pathogenen Pflanzen- und tierischen RNA-Viren haben sich dsRNA Viren bei Hefen in besonderer Weise an diese adaptiert, indem sie sich vertikal durch Zellfusion verbreiten. Solche häufig stattfindenden Paarungsereignisse bei Hefe machen eine extrazelluläre Übertragungsrouten überflüssig (Wickner, 1989). Aufgrund von *in vitro* Transfektionsexperimenten von Nicht-Killerstämmen mit isolierten, aufgereinigten VLPs, kann eine VLP-Infektion als natürlicher Verbreitungsweg nicht ausgeschlossen werden (Schmitt und Tipper, 1990; El-Sherbeini und Bostian, 1987; Schmitt und Neuhausen, 1994). Killerstämme der Hefe *S. cerevisiae* wurden aufgrund von fehlender Kreuzimmunität, ihren molekularen und physikochemischen Eigenschaften sowie ihren Abtötungsmechanismen drei Hauptklassen (K1, K2 und K28) zugeordnet, jede charakterisiert durch die Bildung eines einzigartigen Killertoxins sowie einer spezifischen Immunitätskomponente (Tipper und Schmitt, 1991; Wickner, 1992; Breinig, *et al.* 2006). In diesen Killerstämmen koexistieren jeweils ein klassisches, autonom replizierendes L-A-Helfervirus und ein den Toxinvorläufer kodierendes M-Satellitenvirus (ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28; wobei ScV für „*S. cerevisiae* Virus“ steht) stabil im Cytoplasma (Bevan und Somers, 1969; Somers und Bevan, 1969; Tipper und Bostian, 1984). M-dsRNA-Viren wären ohne L-A-Helferviren nicht überlebensfähig und es würde zu keiner Ausprägung des Killerphänotyps kommen, da die M-Genome von hefeeigenen Enzymen weder repliziert noch transkribiert werden. Zellen, die nur ein L-A-Virus enthalten oder dsRNA frei sind, verhalten sich gegen die einzelnen Toxine ebenso sensitiv wie Zellen, welche das toxinkodierende M-Virus verloren haben (Pfeiffer und Radler, 1984; Schmitt und Tipper, 1992).

Das L-A-Helfervirus zählt zur Familie der *Totiviridae* und besitzt wie andere Vertreter ein in eine ikosaedrische Hülle verpacktes Genom aus einem einzigen dsRNA-Segment (Baker *et al.*, 1999). Kryoelektronenmikroskopie des *S. cerevisiae* L-A Virus zeigte, dass die Partikel einen Durchmesser von 430 Å besitzen und aus 120 Untereinheiten des Kapsidproteins Gag bestehen, welche in 60

asymmetrischen Dimeren angeordnet sind. Caston *et al.* zeigten 1997, dass kleine Öffnungen mit 10-15 Å Durchmesser die Kapsidwand durchlöchern und ein molekulares Sieb bilden, das den Austritt der RNA-Transkripte und den Einstrom essentieller Metabolite für Replikation und Transkription erlaubt, gleichzeitig jedoch dsRNA zurückhält und den Eintritt degradierender Enzyme verhindert (Caston *et al.*, 1997). Das L-A-Genom besitzt eine Größe von 4,6 kb, wobei der kodogene (+)Strang der dsRNA zwei offene Leseraster (ORF) enthält, welche das Kapsidprotein Gag und die als Fusionsprotein Gag/Pol exprimierte RNA-abhängige RNA-Polymerase kodiert. Beide Leseraster überlappen in einem Bereich von 130 Nukleotiden. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt *in vivo* mit Hilfe einer ribosomalen Leserasterverschiebung um eine Base stromabwärts (Icho und Wickner, 1989; Dinman *et al.* 1991). Der virale Replikationszyklus beruht auf dem Mechanismus der konservativen Replikation und ist, da M-Satellitenviren die Gag und Gag/Pol-Proteine des L-A-Helfervirus parasitieren, überwiegend identisch bei L-A und M-Viren. Nach der Transkription der dsRNA *in viro* gelangt der kodogene (+)Strang in das Cytoplasma, wo unter Expression der Proteine Gag und Gag/Pol dessen Translation stattfindet. Sobald die Konzentration des Gag/Pol-Translationsproduktes im Cytoplasma ausreichend hoch ist, bindet es eine Stamm-Schleife-Struktur seines eigenen (+)Strang-„Messengers“ und initiiert dadurch dessen Verpackung in neue Virionen (Wickner *et al.*, 1995; Fujimura *et al.*, 1990). Sobald die Assemblierung des Kapsids abgeschlossen ist, wird der virale Replikationszyklus durch die *in viro* Synthese eines neuen (-)Stranges durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase vollendet (Wickner, 1993; 1996).

Die drei Toxin-kodierenden M-dsRNA Viren von *S. cerevisiae* besitzen keine signifikanten Sequenzhomologien (Schmitt und Tipper, 1990; 1991) und schließen sich gegenseitig auf Ebene der viralen Replikation aus. Aufgrund einer fehlenden Kreuzimmunität kann von einer Hefezelle immer nur ein Toxintyp produziert werden: entweder K1, K2 oder K28 sowie ein spezifischer Immunkomplex, der den Killerzellen die

notwendige Immunität gegen ihr eigenes Toxin verleiht (Breinig *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu L-A setzt sich das Genom der M-Satellitenviren aus zwei Kopien der kleineren M-dsRNA zusammen – ein Phänomen, das als „headful replication“ bezeichnet wird und von filamentösen Phagen bekannt ist. Sie enthalten die Information für ein Präprotoxin (pptox), welches auch die Immunität gegen das eigene Toxin kodiert (Wickner, 1996; Breinig *et al.*, 2006).

## 1.2 Prozessierung des Toxinvorläufers und Toxinsekretion

Trotz geringer Sequenzhomologien und fundamentalen Unterschieden im Wirkungsmechanismus zeigen die Killertoxine K1 und K28 erhebliche Übereinstimmungen hinsichtlich Synthese, Prozessierung und Toxinsekretion. Beide Toxine werden als Vorläufer mit ähnlicher Struktur translatiert und unterliegen innerhalb des Sekretionsweges diversen posttranslationalen Modifikationen und Prozessierungsschritten, bevor die Sekretion des reifen, heterodimeren Proteintoxins erfolgt. Die M28-cDNA enthält einen einzigen Leserahmen (ORF), welcher für das 345 Aminosäuren große Präprotoxin (pptox) kodiert. Mittels *in vitro* Translation konnte die Größe des Toxinvorläufers auf etwa 38 kDa geschätzt werden (Schmitt, 1995). Schmitt und Tipper konnten zeigen, dass die *in vivo* Expression dieser M28-cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven *PGK*-Promotors in der Sekretion von biologisch aktivem Toxin resultiert und der produzierenden Hefe überdies Immunität verleiht (Schmitt und Tipper, 1990; 1995). Die M28-cDNA kodiert somit neben dem Toxin eine spezifische Immunitätskomponente. Der K28-Toxinvorläufer besteht aus einer 10,5 kDa großen, hydrophoben  $\alpha$ -Untereinheit, welche die eigentliche toxische Komponente darstellt und N-terminal von einer pro-Region mit bislang unbekannter Funktion sowie einer hydrophoben Signalsequenz, die den posttranslationalen ER-Import steuert, flankiert wird. C-terminal von  $\alpha$  ist die  $\beta$ -Untereinheit (11 kDa) lokalisiert, die nicht nur die Toxinbindung an die Oberfläche der sensitiven Zielzelle, sondern

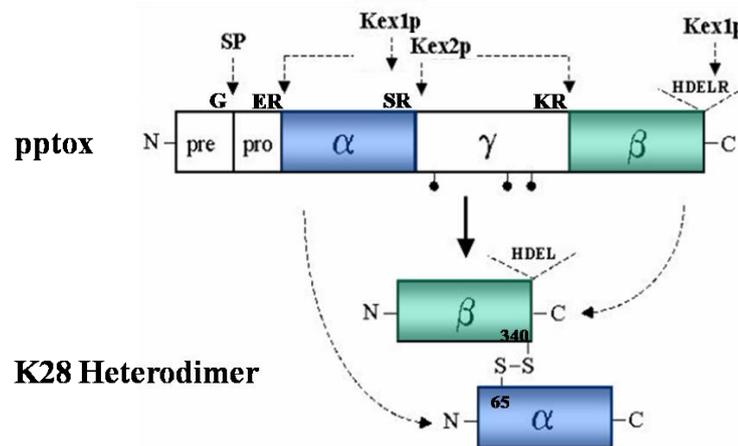
zudem den retrograden Transport über Golgi und ER steuert. Beide Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sind durch eine N-glykosylierte  $\gamma$ -Sequenz getrennt (Schmitt und Breinig, 2002; Eisfeld *et al.*, 2000).

Zur Aufklärung der Prozessierung des K28pptoX und zur Identifizierung von an diesem Prozess beteiligten Komponenten wurde nach Hefe-Mutanten „gescreent“, die zwar noch immun, jedoch nicht mehr in der Lage sind, aktives Toxin zu sezernieren. Auf diese Weise gelang es Wickner und Leibowitz (1976) die beiden Genloci *KEX1* und *KEX2* zu identifizieren. Fuller *et al.* beschrieben Kex2p als eine Subtilisin-ähnliche Endoprotease, welche bevorzugt nach den Dipeptiden Lys-Arg oder Arg-Arg spaltet (Fuller *et al.* 1989). Bei Kex1p handelt es sich hingegen um eine Serin-Carboxypeptidase, welche die basischen C-terminalen Aminosäuren entfernt, die durch die Kex2p-Aktivität exponiert wurden (Dmochowska *et al.* 1987). Beide Proteasen liegen membranverankert im späten *trans*-Golgi-Kompartiment vor, wobei ihre aktiven Zentren in das Golgi-Lumen weisen (Bryant und Boyd, 1993). Substrate wie der Präpro- $\alpha$ -Faktor sowie die Vorläufer der Killertoxine K1, K2 und K28 werden auf dem Sekretionsweg analog zu Pro-Insulin und Pro-Hormonen höherer Eukaryoten prozessiert. Im Verlauf dieser Kex1p/Kex2p-Prozessierung werden die N-glykosylierte  $\gamma$ -Sequenz sowie die vor der  $\alpha$ -Untereinheit gelegene pro-Region des K28pptoX entfernt und die entstehenden C-Termini von  $\alpha$  und  $\beta$  gekürzt. Letztendlich resultiert diese Prozessierung in der Sekretion des reifen  $\alpha/\beta$ -heterodimeren K28-Toxins (21 kDa), in welchem  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheit durch eine einzelne Disulfidbrücke verknüpft sind (Riffer *et al.*, 2002). Die Kex1p- und Kex2p-Funktionen sind essenziell für die Reifung des nativen K28-Toxins. Zwar sind in einer  $\Delta kex1$ -Nullmutante weder Toxinproduktion noch -sekretion negativ beeinflusst - Eisfeld konnte in ihrer Dissertation (2001) nachweisen, dass die K28-Sekretion der Mutante um den Faktor 2 erhöht war - die biologische Aktivität des sezernierten Toxins war jedoch mindestens um 80% verringert (Schmitt und Tipper, 1995; Eisfeld, 2001). Ist hingegen das *KEX2*-Gen deletiert, ist die Sekretion des reifen Toxins vollständig inhibiert (Schmitt und

Tipper, 1995). Entsprechende Hefemutanten weisen jedoch eine funktionelle Immunität auf, die vermutlich auf die Wirkung des unprozessierten Vorläufers zurückzuführen ist (Boone *et al.*, 1986; Schmitt und Tipper, 1992; 1995; Breinig *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zum K1pptoX erfolgt der ER-Import des K28-Toxinvorläufers posttranslational. So sind  $\Delta sec71$ ,  $\Delta sec72$  und  $sec62$ -Mutanten, deren Genprodukte am SRP-unabhängigen posttranslationalen ER-Import beteiligt sind, kaum mehr in der Lage, K28-Toxin zu sezernieren. Auch die cytosolischen Chaperone Ssa1p und Ssa2p, die am posttranslationalen ER-Import beteiligt sind, spielen eine Rolle bei der Toxinsekretion (Breinig *et al.*, 2006). Einmal im ER wird die pptoX-Prozessierung durch Signalpeptidase-Spaltung eingeleitet. Die Deletion zweier Gene (*SPC1* und *SPC2*), die für nicht-essentielle Untereinheiten des Signalpeptidase-Komplexes kodieren, führt zu einem Defekt in der Sekretion des reifen Toxins (Sendzig, 2006). Mittels ortsgerechter Mutagenese gelang es Riffer (2002) die genauen Prozessierungsstellen innerhalb des K28-pptoX zu identifizieren. Zum besseren Überblick ist die K28pptoX-Prozessierung in Abbildung 1 schematisch dargestellt. So führt der Austausch des Aminosäurerestes Gly<sup>36</sup> zu Arg<sup>36</sup> phänotypisch zu sensitiven Nicht-Killern, die sich durch fehlende Toxinsekretion auszeichnen. Dieser Gly<sup>36</sup>-Rest konnte als Spaltstelle der Signalpeptidase identifiziert werden. Ebenso wurde die Erkennungssequenz der Kex2p-Protease am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit ermittelt, die zur Abspaltung der pro-Region führt (Glu-Arg<sup>49</sup>). Durch die Prozessierung am  $\alpha$ -C-terminalen Arg<sup>149</sup> sowie am  $\beta$ -N-Terminus nach Lys-Arg<sup>245</sup> wird die dazwischenliegende  $\gamma$ -Sequenz entfernt. Der Kex1p-Spaltung des Arg<sup>345</sup> am  $\beta$ -C-Terminus kommt eine besondere Funktion zu. Durch diese Prozessierung wird das ER-Retentionssignal HDEL(R) am  $\beta$ -C-Terminus, welches für den retrograden Transport des reifen Toxins in der Zielzelle verantwortlich ist, demaskiert, woraufhin das gereifte Toxin sezerniert werden kann (Eisfeld *et al.*, 2000; Riffer *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu bakteriellen Toxinen mit H/KDEL(-ähnlichen) Motiven wird das K28-Toxin in der

Wirtszelle exprimiert. Daher muss dieses Motiv zwingend im frühen Sekretionsweg maskiert werden, um die Sekretion des reifen Toxins zu gewährleisten. Tatsächlich bringt die *in vivo* Expression eines Toxinderivates nach Deletion des maskierenden Arginin-Restes immune Nichtkiller hervor (Eisfeld, 2001). Somit verhindert der Arginin-Rest am C-Terminus des HDEL-Motivs nicht nur den retrograden Transport von K28 in das ER einer Toxin-produzierenden Zelle, sondern ist für dessen Sekretion essentiell (Eisfeld *et al.*, 2000). Die Peptidsequenz HDELR dient im Vorläufertoxin wahrscheinlich der korrekten Faltung von K28 im ER, da durch dieses Motiv eine längere Verweildauer im ER erzielt wird (Spindler, 2004).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung des K28 Vorläufers im Hefe-Sekretionsweg.** Durch Mitwirkung des Signalpeptidase-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum und weitere Prozessierung im *trans*-Golgi-Kompartiment durch die Proteasen Kex1p und Kex2p wird das K28-Toxin schließlich als reifes,  $\alpha/\beta$ -Heterodimer (21 kDa) sezerniert, in dem  $\alpha$  und  $\beta$  durch eine einzelne Disulfidbrücke zwischen  $\alpha$ -Cys<sup>65</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>340</sup> verknüpft vorliegen (verändert nach Schmitt und Breinig, 2002).

Im reifen  $\alpha/\beta$ -Heterodimer sind  $\alpha$  und  $\beta$  durch eine einzelne Disulfidbrücke zwischen  $\alpha$ -Cys<sup>56</sup> und  $\beta$ -Cys<sup>340</sup> verbunden. Diese Disulfidbrücke unterstützt auf Ebene der Plasmamembran die korrekte Ausrichtung des HDEL-Motivs relativ zum HDEL-Rezeptor Erd2p (Riffer *et al.*, 2002), eine Funktion, die auch für andere Toxine mit H/KDEL-Motiv beschrieben wurde (Pelham *et al.*, 1992).

### 1.3 Internalisierung und retrograder Transport

Den Killertoxinen K1, K2 und K28 der Hefe *S. cerevisiae* ist gemeinsam, dass sie ihre Zielzelle Rezeptor-vermittelt in zwei Schritten abtöten. In einem ersten, energieunabhängigen Schritt binden die Toxine an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Zellwand. K1 und K2 nutzen hierbei ein  $\beta$ -1,6-D-Glukan der Hefezellwand als Primärrezeptor, wohingegen das K28-Toxin ein hochmolekulares  $\alpha$ -1,3-Mannoprotein erkennt (Hutchins und Bussey, 1983; Schmitt und Radler, 1988). Mutationen in Genen, die für die Ausbildung dieser Toxinrezeptoren auf der Zellwand verantwortlich sind (Mannoproteinbiosynthese; *mnn*-Mutanten), führen zur Toxinresistenz. Dieser erste Zellkontakt ist somit essentiell und hat möglicherweise die Funktion, das Toxin auf Ebene der Zellwand zu konzentrieren. Alternativ könnte die Nähe des Toxins zur Zellwand, die durch die Toxinbindung an den Primärrezeptor der Zielzelle hergestellt wird, die endozytotische Internalisierung des Toxins begünstigen (Schmitt und Radler, 1987). Im zweiten Schritt wird das Toxin unter Energieverbrauch zur Plasmamembran transloziert, wo die Bindung an einen Sekundärrezeptor erfolgt. Breinig *et al.* konnten 2002 zeigen, dass K1 an Kre1p bindet, ein transient GPI-verankertes und O-glykosyliertes Zelloberflächen-Protein, das an der  $\beta$ -1,6-D-Glukan-Synthese beteiligt ist (Breinig *et al.*, 2002; 2004). Im Gegensatz zu K1, welches seine Toxizität durch Ionenkanal-Bildung und Disruption der Plasmamembranfunktion auf der Ebene der Plasmamembran vermittelt (Martinac *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 1999), handelt es sich bei K28 um das erste virale Killertoxin, das in die sensitive Zielzelle über Endozytose eindringt und retrograd bis in das Cytosol transportiert wird (Eisfeld *et al.*, 2000). Der Sekundärrezeptor von K28 ist noch nicht eindeutig identifiziert. Jedoch sprechen alle bisherigen Untersuchungen dafür, dass es sich hierbei um den HDEL-Rezeptor Erd2p handelt, der in geringer Zahl in der Plasmamembran kolokalisiert (Spindler, 2004; Sevrieva, 2009; Dausend, persönliche Mitteilung; Heiligenstein, 2008). Eisfeld konnte 2001 in ihrer Dissertation zeigen, dass das  $\beta$ -C-terminale HDEL-Motiv,

welches als ER-Retentionssignal normalerweise den Rücktransport ER-residenter Proteine wie Pdi1p oder Kar2p vom Golgi zum ER vermittelt (Pelham, 1989; 1990), unerlässlich für den retrograden Transport des K28-Toxins ist (Eisfeld, 2001; Schmitt, 1995). Dieses intrazelluläre Targeting-Signal lenkt das Toxin vom frühen endosomalen Kompartiment zum *trans*-Golgi-Netzwerk und verhindert dadurch weitgehend dessen Degradation in der Vakuole. Durch diese Strategie gelingt es dem K28-Toxin, vom Golgi zum ER zu gelangen, wo das Toxin vom HDEL-Rezeptor Erd2p dissoziiert. Anschließend erreicht es über Retrotranslokation das Cytosol. Der unbeladene Rezeptor wandert daraufhin zum Golgi-Apparat zurück, um erneut Proteine zu binden und zum ER zu transportieren (Lewis und Pelham, 1992). Diese Taktik wird auch von anderen invasiven Toxinen angewandt. Solche Toxine besitzen in den meisten Fällen H/KDEL-ähnliche Motive, die den COP-I-vermittelten retrograden Transport ins Cytosol bewerkstelligen. So besitzt das Cholera Toxin ein klassisches KDEL-Motiv, das *Pseudomonas* Exotoxin A (ExoA) hingegen trägt C-terminal das KDEL-ähnliche Motiv REDLK, für das Lord und Roberts zeigen konnten, dass es vom Säuger-KDEL-Rezeptor erkannt und gebunden wird (Jackson *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1991, Lord und Roberts, 1998). Mutagenesestudien zeigten, dass das REDLK-Motiv unabdingbar ist für die Toxizität von ExoA (Chaudhary *et al.*, 1990). Die ER-Retentionssignale bei Cholera Toxin und dem *E.coli* „heat-labile“ Enterotoxin sind zwar nicht zwingend notwendig, sie steigern jedoch die Transporteffizienz der Toxine (Cieplak *et al.*, 1995; Lencer *et al.*, 1995). Pelham identifizierte 1988 das membrangebundene Golgi-Protein Erd2p als H/KDEL-Rezeptor (Pelham, 1988; Lewis *et al.*, 1990, Semenza *et al.*, 1990). Ist das entsprechende Gen in Hefe deletiert, kommt es, ebenso wie bei Mutanten mit Defekt in Erd1p, zur K28-Resistenz (Eisfeld, 2001). Das mit Hilfe des HDEL-Rezeptors Erd2p retrograd ins ER transportierte K28-Toxin wird anschließend ins Cytosol freigesetzt, von wo aus die Toxizität vermittelnde  $\alpha$ -Untereinheit in den Zellkern gelangt und die DNA-Synthese inhibiert. Lange Zeit war der Sec61-Translocon-Komplex als einziger ER-Export-Kanal bekannt.

Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Pilon und Plemper ergaben, dass der Sec61-Kanal fehlgefaltete Proteine zur Degradation ins Cytosol schleust (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997). Auch bakterielle Toxine, wie am Beispiel der A1-Untereinheit des Cholera Toxins gezeigt werden konnte, nutzen das Translokon zur ER-Cytosol-Dislokation (Schmitz *et al.*, 2000). Verschiedene temperatursensitive Mutationen in Sec61p, dem Hauptbestandteil des heterotrimeren Kanals, bewirken eine K28-Resistenz. Das unterstützt die Annahme, dass auch K28 diesen Weg nutzt, um ins Cytosol zu gelangen (Eisfeld, 2001). Durch Zellfraktionierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der ER-Chaperone Kar2p, Pdi1p, Jem1p und/oder Scj1p zur Toxinakkumulation in intrazellulären Membranen führt und eine Toxinresistenz der betreffenden Mutanten bewirkt (Heiligenstein *et al.*, 2006). Anders als bei bakteriellen Toxinen, die sich als fehlgefaltete Proteine tarnen und als Substrat für die ER-assoziierte Degradation (ERAD) erkannt werden, scheint K28 unabhängig von klassischen ERAD-Komponenten wie Hrd1p, Der1p und dem Ubiquitin-Proteasom-System ins Cytosol zu gelangen (Hazes und Read, 1997; Lord *et al.*, 2003; Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein *et al.*, 2006). Erst nach dem ER-Export dissoziiert das heterodimere Toxin durch die reduzierende Umgebung des Cytosols in seine beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  (Heiligenstein *et al.*, 2006). Die  $\beta$ -Untereinheit wird ubiquitiniert und unterliegt einer proteasomalen Degradation, während sich die K28 $\alpha$ -Untereinheit einem Abbau weitgehend entzieht und im Zellkern Toxizität auslöst.

#### 1.4 Toxizität des Killertoxins K28

Ein Großteil der bekannten Killertoxine tötet die Wirtszelle durch Veränderungen der Membranpermeabilität. Neben K28 wurden bislang lediglich zwei Toxine beschrieben, die eine Arretierung des Zellzyklus verursachen: Zymocin aus *Kluyveromyces lactis* und ein Toxin aus *Pichia acaciae* (McCracken *et al.*, 1994; Mehlgarten und Schaffrath,

2003). Bislang ist der Mechanismus, welcher der K28-Toxizität zu Grunde liegt, noch nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass die eigentliche toxische K28 $\alpha$ -Untereinheit ein Signal in den Zellkern vermittelt, wodurch ein Zellzyklus-Arrest am Übergang G1/S und folglich eine schnelle, irreversible Inhibierung der DNA-Synthese bewirkt wird; die Zellen weisen einen präreplikativen DNA-Gehalt (1n) auf. Morphologisch äußert sich der hervorgerufene Zellzyklus-Arrest in einer Anhäufung von Zellen mit einer mittelgroßen Knospe ohne eingewanderten Zellkern (Schmitt *et al.*, 1996; Reiter, 2004; Reiter *et al.*, 2005). Da eine Inhibierung der DNA-Synthese nicht mit einer fortgeschrittenen Knospung vereinbar ist, muss von einem pleiotropen Effekt ausgegangen werden. Das Toxin scheint demnach auf verschiedene zelluläre Vorgänge Einfluss zu nehmen. Reiter konnte mit Hilfe eines „Two-Hybrid-Screens“ eine Reihe kernständiger Proteine als Interaktionspartner von K28 $\alpha$  identifizieren. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass die  $\alpha$ -Untereinheit im Zellkern lokalisiert ist. Eine solche Kernlokalisierung konnte allerdings bislang noch für kein Killertoxin nachgewiesen werden. So muss beispielsweise das zelluläre Ziel des Killertoxins Zymocin, der Elongator-Komplex, in den Kern transportiert werden, um einen G1-Arrest in der Zielzelle zu induzieren. Eine Kernlokalisierung des Toxins selbst ist hier nicht erforderlich (Fichtner *et al.*, 2003). Auch für K28 konnte bis dato kein direkter Nachweis für eine Kernlokalisierung in aufgereinigten Zellkernextrakten Toxin-behandelter Zellen erbracht werden. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der geringen Anzahl von K28 $\alpha$ -Untereinheiten, die tatsächlich bis in den Zellkern gelangen. K28 $\alpha$  besitzt keines der bekannten Kernlokalisierungssignale (NLS). Es besteht somit die Möglichkeit, dass K28 die Toxizität über eine Signalkaskade in den Nukleus vermittelt. Dagegen spricht, dass Derivate der K28 $\alpha$ -Untereinheit, welche N-terminal ein klassisches NLS-Motiv des SV40-Virus tragen, sehr viel toxischer sind, als die wildtypische K28 $\alpha$ -Untereinheit. Ein aktiver Import in den Zellkern erhöht demzufolge die Toxizität von K28 (Reiter, 2004). Ein solcher gerichteter Transport über

Importine scheint jedoch *in vivo* nicht stattzufinden, da die getesteten Importin-Mutanten Wildtyp-Sensitivität aufweisen. Ein Ko-Transport des Toxins „huckepack“ durch Interaktion mit kernständigen Proteinen im Cytosol ist ebenso wenig wahrscheinlich. Aufgrund seiner geringen Größe von 10,5 kDa wäre K28 $\alpha$  durchaus in der Lage, durch freie Diffusion passiv in den Kern zu gelangen, obwohl kleine Proteine in den meisten Fällen ebenfalls aktiv transportiert werden. Ein indirekter Nachweis für eine Kernlokalisierung konnte durch Test von Mutanten erbracht werden, die einen Defekt im Aufbau der Kernporenstruktur aufweisen. So wurden drei Nukleoporine identifiziert, deren Deletion zu verminderter Sensitivität führt. Zwei weitere Nukleoporinmutanten zeigten Hypersensitivität gegen K28-Toxin (Reiter, 2004). Mit Hilfe eines „Yeast-Two-Hybrid Screenings“ ist es Reiter gelungen, sechs zelluläre Proteine, darunter vier essentielle Proteine, als *in vivo* Interaktionspartner von K28 $\alpha$  zu identifizieren. Mit einer Ausnahme besitzen alle Proteine nukleäre Lokalisation. Das wiederum die These unterstützt, dass K28 $\alpha$  im Zellkern vorliegt. Zudem sind die Proteine alle beteiligt an der Expression oder dem Abbau von Zyklinen und könnten somit grundsätzlich geeignete Angriffspunkte des Toxins darstellen, da die Kontrolle des Zellzyklus durch eine veränderte Expression erheblich beeinträchtigt wird. Durch nachfolgende Ko-Immunpräzipitationen konnte eine Interaktion von K28 $\alpha$  mit TBP, Apc2p und Zds1p *in vitro* verifiziert werden (Reiter, 2004). Das TATA-Bindeprotein TBP ist essentiell für die Initiation der Transkription. Tatsächlich ergaben Transkriptions-Analysen eine frühe Toxin-induzierte Hemmung der Transkription der G1-Zykline *CLN1* und *CLN2* (Zellen am Übergang zur S-Phase weisen normalerweise die höchste *CLN1,2*-Konzentration auf), die alleine jedoch nicht ausreicht, um den K28-spezifischen Phänotyp und den G1-Bock auszulösen (Reiter, 2004). Möglicherweise verhindert eine Bindung von K28 $\alpha$  an TBP die Assoziation bestimmter TBP-assoziiierter Faktoren (TAF), wodurch die Transkription der durch die TAFs regulierten Gene nicht mehr optimal erfolgen kann. Da bei einer Überexpression von *CLN1* und *CLN3* einige Zellen auftreten, deren

Morphologie auf einen typischen G2-Zellzyklus-Arrest hindeutet, muss davon ausgegangen werden, dass K28 mehrere zelluläre Prozesse beeinträchtigt. Ein zweiter Prozess, der durch die K28-Wirkung gestört ist, betrifft den Abbau der B-Typ-Zykline Clb1p-4p durch den Anaphase-Promoting-Komplex (APC). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass eine temperatursensitive APC-Mutante eine verminderte Sensitivität gegen K28 zeigt (Reiter, 2004). Apc2p, für das eine *in vivo* Interaktion mit K28 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte, bildet die E3-Komponente des APC und stellt somit einen essentiellen Bestandteil des APC dar. Eine Inhibierung des APC führt zu einem gestörten Abbau der B-Typ-Zykline, wodurch der Übergang in die M-Phase erschwert und ein G2-Arrest induziert wird (Jackson *et al.*, 2000). Auch diese Wirkung alleine widerspricht dem finalen K28-Phänotyp. Das Zusammenspiel beider Effekte könnte jedoch den terminalen Phänotyp hervorrufen, da der Übergang in die G1-Phase erschwert wird und gleichzeitig der Übergang in die M-Phase gestört ist. Die Identifizierung weiterer beteiligter Zellzyklus-relevanter Proteine mittels Deletions-„Screen“ und TAP-„Tagging“ deutet auf einen sehr komplexen Wirkmechanismus von K28 hin, der mindestens zwei Prozesse umfasst (Reiter, 2004).

Auch konnte gezeigt werden, dass in der Wirtszelle apoptotische Prozesse ausgelöst werden, wenn die K28-Konzentration subletal ist (Reiter *et al.*, 2005). 1997 wurde erstmals apoptotisches Absterben in einer Hefe-Zellzyklus-Mutante beobachtet (Madeo *et al.*, 1997). Da inzwischen mehrere Substanzen beschrieben wurden, die in subletalen Konzentrationen Apoptose in Hefe auslösen, wurde vermutet, dass niedrige Konzentrationen an Killertoxin im Medium einen entsprechenden Phänotyp erzeugen könnten (Madeo *et al.* 1999; Ludovico *et al.*, 2001). Im natürlichen Hefe-Habitat sind die Toxinkonzentrationen eher gering, so dass der Apoptose in diesem Umfeld vermutlich eine entscheidende Bedeutung zukommt, um die Zielzellen effektiver abtöten zu können. Auf diese Weise sichert sich der Toxinproduzent einen Wachstumsvorteil. Ähnliche Mechanismen werden auch von Shiga Toxin oder *Pseudomonas* Exotoxin A genutzt

(Weinrauch und Zychlinsky, 1999). Reiter konnte 2004 mit Hilfe verschiedener Tests auf apoptotische Marker einen solchen „Selbstmord“ in Hefen nachweisen, die mit geringen Konzentrationen der Toxine K1, K28 oder Zygocin behandelt wurden. Der spezifische Wirkungsmechanismus des jeweiligen Toxins ist hierbei unbedeutend. Selbst nach intrazellulärer Expression verschiedener K28-Derivate konnten apoptotische Marker nachgewiesen werden (Reiter, 2004). Da die Apoptose einen aktiven Prozess darstellt, gilt ein langsamer Sterbeprozess der Zelle als notwendige Voraussetzung für die Induktion dieses Selbstmordprogrammes (Sanchez *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 1999). Madeo *et al.* charakterisierten 2002 erstmals eine Meta-Caspase in Hefe (Madeo *et al.*, 2002). Die Deletion des entsprechenden Gens *YCA1* führt in der Tat zur schwächeren Ausprägung von Apoptosemarkern. Folglich scheint die Toxin-induzierte Apoptose ein Caspase-gesteuerter Prozess zu sein. Das frühe Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) deutet zudem auf deren Beteiligung bei der Induktion der Apoptose (Reiter *et al.*, 2005).

## 1.5 Immunität

Generell sind zwei Möglichkeiten der Immunitätsentwicklung bei Toxinproduzierenden Hefen denkbar. Entweder eine Re-Internalisierung des sezernierten Toxins wird verhindert oder das aktive Toxin, das in die Toxinproduzierende Zelle eindringt, wird inaktiviert. Dies kann noch innerhalb des retrograden Transports im Sekretionsweg geschehen oder erst im Cytosol. In einer K1-Killerzelle resultiert die Immunität vermutlich aus der Wechselwirkung des K1p<sub>tox</sub> mit seinem Sekundärrezeptor Kre1p während der Sekretion. Diese Interaktion führt zur Umlenkung des Rezeptor-Toxin-Komplexes in die Vakuole (Sturley *et al.*, 1986; Schmitt und Breinig, 2006). Zhu *et al.* gelang der Nachweis, dass ein N-terminales Fragment der  $\gamma$ -Komponente des K1p<sub>tox</sub> ausreichend ist für die Ausprägung einer funktionellen Immunität (Zhu *et al.*, 1993). Breinig *et al.* postulierten 2006 einen ganz

anderen Mechanismus für die Ausprägung einer funktionellen K28-Immunität. Ihnen gelang der gleichzeitige Nachweis des K28-Vorläufers ppto<sub>x</sub> und des reifen  $\alpha/\beta$ -heterodimeren Toxins in der cytosolischen Fraktion eines K28-Killerstammes (Breinig *et al.*, 2006). Die Menge an reifem, cytosolischem K28 stieg signifikant an, wenn den Zellen zusätzlich exogenes Toxin zugeführt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die Toxinaufnahme in K28-Killerhefen nicht beeinträchtigt ist. Vielmehr sind sie in der Lage, das von ihnen sezernierte Toxin zu internalisieren und ebenso wie sensitive Zielzellen ins Cytosol zu transportieren. Folglich muss der Mechanismus der Immunität auf der Inaktivierung des re-internalisierten Toxins beruhen und das reife Toxin muss unschädlich gemacht werden, bevor es den Zellkern erreichen kann. Der Austausch der K28-Signalsequenz (pre) durch das hydrophobere Signalpeptid von K1ppto<sub>x</sub>, welches den kotranslationalen ER-Import favorisiert, steigert die Anfälligkeit gegen das eigene K28-Toxin enorm. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass der posttranslationale ER-Import von K28ppto<sub>x</sub> dessen Konzentration im Cytosol auf einem bestimmten Niveau hält und dass ein kritisches Level erreicht werden muss, um eine funktionelle Immunität zu sichern (Breinig *et al.*, 2006). Durch intrazelluläre Expression verschiedener verkürzter K28ppto<sub>x</sub>-Varianten konnte gezeigt werden, dass die Toxizität vermittelnde  $\alpha$ -Untereinheit maßgeblich an der Entwicklung einer funktionellen Immunität beteiligt ist, alleine jedoch nicht ausreicht, um eine vollständige Immunität sensibler Hefen zu erzielen. Weitere Versuche deuteten daraufhin, dass eine beliebige C-terminale Verlängerung der  $\alpha$ -Untereinheit notwendig und ausreichend ist. Beispielsweise bringt eine Deletion von *KEX2* phänotypisch immune Nichtkiller hervor, da die  $\alpha$ -C-terminale  $\gamma$ -Sequenz nicht entfernt werden kann (Schmitt, 1995). Mit Hilfe eines His-getaggten K28-Vorläufers ohne prepro-Region gelang es, den gebildeten Komplex zwischen K28ppto<sub>x</sub> und re-internalisiertem Toxin zu isolieren. Diese Komplexbildung stellt den Schlüsselschritt der Immunitätsentwicklung dar. Eine weitere notwendige Voraussetzung für die Immunität liegt in

der Ubiquitinierung und dem anschließenden proteasomalen Abbau des cytosolischen Komplexes. Eine stark beeinträchtigte Immunität lässt sich in proteasomalen Mutanten sowie in Mutanten mit Defekt im Polyubiquitinierungsprozess (nach Überexpression der Ubiquitinvariante Ub-RR<sup>48/63</sup>, nach Deletion des Deubiquitinierungsenzyms Doa4p sowie nach intrazellulärer Expression Lysin-freier K28-Derivate) feststellen. Diese Beobachtungen stützen die These, dass die Degradation der  $\alpha/\beta$ -Komponente innerhalb des gebildeten Komplexes notwendig ist, um ausreichend freies K28p<sub>tox</sub> für die Sekretion des reifen Toxins sowie für das Abfangen und die Eliminierung des re-internalisierten Toxins bereitzustellen (Breinig *et al.*, 2006).

## 2. A/B-Toxine und ERAD

Bei Toxinen der A/B-Familie, zu welcher auch das Killertoxin K28 zählt, sind die Funktionen der Zytotoxizität und intrazellulären Zielsteuerung des Toxins strukturell getrennt. Diese beiden strukturellen Komponenten werden als A- und B-Untereinheit bezeichnet, wobei erstere die katalytisch aktive Komponente darstellt (Gill, 1978). Der Eintritt in die Zelle wird durch Bindung der B-Untereinheit(en) des Toxins an Zelloberflächen-Rezeptoren initiiert, gefolgt von Rezeptorvermittelter Endozytose. Man unterscheidet generell zwei Mechanismen, über die invasive A/B-Toxine, deren zellulärer Angriffspunkt nicht auf Ebene der Plasmamembran, sondern im Cytosol oder Zellkern liegt, das Cytosol erreichen. Toxine wie das Diphtherie Toxin (DT) gelangen direkt aus den sauren Endosomen ins Cytosol. Verantwortlich für die Translokation ist hierbei eine pH-induzierte Konformationsänderung des Toxins (Draper und Simon; 1980). Die Toxizität der zweiten Toxingruppe wird blockiert, sobald der Golgi-Apparat, z.B. durch Brefeldin A-Behandlung, zerstört wird. Diese Beobachtung lässt sich darauf zurückführen, dass diese Toxine nach Internalisierung den Sekretionsweg der Zielzelle retrograd (oft mit Hilfe eines C-terminalen ER-Retentionssignals) durchlaufen, um an ihren

Zielort, das Cytosol, zu gelangen. Pelham *et al.* konnten 1992 nachweisen, dass RTA, die toxische A-Untereinheit des Pflanzentoxins Ricin, vom ER ins Cytosol transloziert wird (Pelham *et al.*, 1992). Zu den bekanntesten Vertretern dieser zweiten Gruppe zählen das Cholera Toxin (CT), Pertussis Toxin (PT), Shiga(-like) Toxine S(L)T und Ricin (Hazes und Read, 1997). Auch das Hefe-Killertoxin K28 nutzt diesen retrograden Transportweg von frühen Endosomen über das *trans*-Golgi-Netzwerk bis hin zum endoplasmatischen Retikulum (Heiligenstein *et al.*, 2006). Wie die Toxine nun vom ER ins Cytosol gelangen, war lange Zeit völlig unbekannt. Neuere Studien belegen, dass sowohl Cholera Toxin als auch Ricin und *Pseudomonas* Exotoxin A das ER über das Sec61-Translokon verlassen (Sandvig und van Deurs, 2002; Schmitz *et al.*, 2000; Wesche *et al.*, 1999; Koopmann *et al.*, 2000). Für einige dieser Toxine konnte zudem gezeigt werden, dass sie neben Sec61p weitere Komponenten der ER-Qualitätskontrolle benötigen, um ins Cytosol transportiert zu werden (Simpson *et al.*, 1999; Yu und Haslam, 2004; Bernardi *et al.*, 2007).

Das endoplasmatische Retikulum stellt einen wichtigen Ort der Protein-Qualitätskontrolle dar. Fehlgefaltete oder fehlassemblierte multimere Proteine müssen in ihre korrekte Konformation überführt werden, da sie zur Aggregation neigen und so ER-Stress auslösen, welcher mit der Entstehung einer Reihe teils schwerwiegender Krankheiten in Verbindung steht. Sobald es zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER kommt, werden mehrere Signalwege induziert, die zur gesteigerten Expression von Faltungsmediatoren (Chaperonen) führen und in ihrer Summe als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnet werden. Kann das Problem dennoch nicht behoben werden, werden die fehlgefalteten Proteine ins Cytosol transportiert, wo sie polyubiquitiniert und im Proteasom degradiert werden. Diesen selektiven Export von Proteinen aus dem ER nennt man ER-assoziierte Degradation (ERAD) (McCracken und Brodsky, 1996; Werner *et al.*, 1996; Sommer und Wolf, 1997). Im Allgemeinen folgt dieser Prozess einem bestimmten Schema. Zunächst müssen fehlgefaltete Proteine als ERAD-Substrate erkannt

und von sich faltenden oder korrekt gefalteten Proteinen unterschieden werden. Spekuliert wird, dass Chaperone, wie das Hsp70 Chaperon Kar2p/BiP, ein strukturelles Merkmal fehlgefalteter luminaler Proteine erkennen, beispielsweise eine bestimmte Glykanstruktur (Plemper *et al.*, 1997; Römisch, 2005). Den cytosolischen Hsp70 Chaperonen Ssa1-4p wird eine Rolle bei der Erkennung integraler Membransubstrate zugesprochen (Zhang *et al.*, 2001). Weitere Chaperone halten die ERAD-Substrate in einer löslichen, translokationskompetenten Form (Nishikawa *et al.*, 2001) und geleiten sie zu einem Protein-führenden Kanal, durch welchen anschließend der Transport ins Cytosol erfolgt. Auf der cytosolischen Seite der ER-Membran angekommen, werden die meisten Substrate mit Hilfe verschiedener Ubiquitin-konjugierender und -ligierender Enzyme polyubiquitiniert. Diese Polyubiquitinketten markieren die Proteine für den Transport zum Proteasom, wo sie anschließend degradiert werden. An der Erkennung der Polyubiquitinreste ist der Cdc48p/Ufd1p/Npl4p-Komplex beteiligt, der womöglich durch ATP-Hydrolyse auch die treibende Kraft für den ER-Export liefert und die ERAD-Substrate aus der ER-Membran zieht (Carvalho *et al.*, 2006).

Abhängig von der Lokalisierung des Defekts innerhalb eines Proteins scheinen ERAD-Substrate verschiedene Wege zu nutzen (Huyer *et al.*, 2004; Vashist und Ng, 2004, Carvalho *et al.*, 2006). Proteine mit fehlgefalteten luminalen Domänen, sogenannte ERAD-L-Substrate, werden vergleichsweise langsam degradiert ( $t_{1/2}$  = 27-35 min im Vergleich zu 8-12 min bei Membransubstraten; Vashist und Ng, 2004) und scheinen zunächst zum *cis*-Golgi zu wandern, bevor sie aus dem ER exportiert werden. Die Hrd1p-Ligase vermittelt hier die Substrat-Polyubiquitinierung (Bays *et al.*, 2001; Bordallo *et al.*, 1998; Hampton *et al.*, 1996). Weiter unterscheidet man ERAD-M und ERAD-C, einen Weg, der die schnelle Degradation von Proteinen mit fehlgefalteten cytosolischen Domänen mit Hilfe des Doa10-Ligase-Komplexes steuert (Swanson *et al.*, 2001). Letzterem unterliegen Substrate mit fehlgefalteten Intramembran-Domänen. Dieser Weg ähnelt ERAD-L, ist jedoch unabhängig von Usa1p und Der1p. Alle drei Wege haben die

Beteiligung des Cdc48/Ufd1/Npl4-ATPase-Komplexes gemeinsam. Die genauen Unterschiede der einzelnen Mechanismen sind bislang unbekannt. Es wird vermutet, dass sich einige A/B-Toxine als ERAD-Substrate tarnen, um auf diese Weise ins Cytosol transportiert zu werden (Hazes und Read, 1997). Strukturanalysen von A/B-Toxinen, die retrograd bis ins ER wandern, zeigten, dass dort nach der Dissoziation der A- und B-Untereinheiten hydrophobe Bereiche exponiert werden, die möglicherweise als Erkennungssignal für ER-Chaperone dienen und die Toxine als fehlgefaltete Proteine markieren. Cholera Toxin und *E. coli* heat labile Toxin (LT) besitzen jeweils eine kleine hydrophobe A<sub>13</sub>-Domäne (Zhang *et al.*, 1995), welche über einen flexiblen Linker an die kompakte katalytische Domäne angeheftet ist. Im Holotoxin wird diese Domäne durch eine Disulfidbrücke stabilisiert. Die Proteindisulfidisomerase Pdi1p katalysiert die Reduktion besagter Disulfidbrücke (Tsai *et al.*, 2001), wodurch die hydrophoben Domänen freigelegt und nach anschließender Dissoziation des Holotoxins in entfaltetem Zustand gehalten werden. Ähnliche hydrophobe Peptide wurden auch in anderen Toxinen identifiziert. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die A-Untereinheiten von Cholera Toxin, ExoA und Ricin nach Reduktion der Disulfidbrücken und Dissoziation stärker mit Lipidmembranen interagieren (Ishida *et al.*, 1983; Hausman und Burns, 1992; Tomasi und Montecucco, 1981). Aufgrund dieser Beobachtung kann darauf geschlossen werden, dass durch die Dissoziation des Holotoxins exponierte hydrophobe Regionen für die verstärkte Lipidbindung verantwortlich sind.

Generell müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein, damit defekte Proteine ins Cytosol überführt werden können. Da fehlgefaltete Proteine zur Aggregation neigen, müssen sie mit Hilfe von Chaperonen in löslicher Form gehalten werden. An dieser Stelle wirkt das Hsp70 Chaperon Kar2p/BiP, welches zusammen mit seinen Hsp40 Co-Chaperonen Scj1p und Jem1p den ER-Export von ERAD-Substraten ins Cytosol erleichtert, indem es Aggregatbildungen im ER-Lumen verhindert (Pilon *et al.*, 1998; Nishikawa, *et al.*, 2001). BiP ist zudem verantwortlich für die Erkennung defekter Proteine und überführt diese

zum Sec61-Translokon-Komplex (Simons *et al.*, 1995). Eine Wechselwirkung mit A/B-Toxinen während der ER-Cytosol-Dislokation, wie sie für Shiga Toxin gezeigt werden konnte (Yu und Haslam, 2005), ist also durchaus zu erwarten. Ferner scheint zumindest eine teilweise Entfaltung der beschädigten Proteine für deren Retrotranslokation notwendig zu sein. Die Proteindisulfidisomerase erzielt diese Entfaltung durch Reduktion der Disulfidbrücken und überführt die Substrate auf diese Weise in eine translokations-kompetente Konformation (Gillece *et al.*, 1999; Molinari *et al.*, 2002; Wahlmann *et al.*, 2007). Tsai *et al.* konnten 2001 zeigen, dass Pdi1p die Disulfidbrücke der A-Untereinheit von Cholera Toxin (CTA) reduziert, wodurch die aktive A1-Kette freigesetzt wird (Tsai *et al.*, 2001). Auch für K28 konnte anhand von Zellfraktionierungsstudien an *pdi1*-Mutanten gezeigt werden, dass entsprechende Hefen vor der Wirkung des Toxins geschützt sind, da K28 nach Internalisierung in intrazellulären Membranen (wahrscheinlich im ER) akkumuliert und nicht in der Lage ist, ins Cytosol zu gelangen (Heiligenstein *et al.*, 2006). Neben den genannten Komponenten konnten mittlerweile eine Reihe von Wechselwirkungen zwischen A/B-Toxinen und weiteren ERAD-Komponenten nachgewiesen werden. Bernardi *et al.* demonstrierten beispielsweise, dass der ER-Cytosol-Transport von CTA durch Überexpression von dominant-negativem Derlin-1 erheblich beeinträchtigt ist (Bernardi *et al.*, 2008).

In der Tat scheinen A/B-Toxine das System der ER-Qualitätskontrolle ausnutzen zu können, indem sie sich als (fehlgefaltete) ERAD-Substrate maskieren und so einen Weg gefunden haben, um aus dem ER-Lumen an ihren Bestimmungsort, das Cytosol zu gelangen. Das unweigerliche Ziel des ERAD-Pathways ist jedoch die proteasomale Degradation. Wie also schaffen es A/B-Toxine, diesem Schicksal zu entgehen? Rodighiero und Mitarbeiter untersuchten 2002 die Rolle der Ubiquitinierung bei der Retrotranslokation des Cholera Toxins. Wird eine Polyubiquitinierung *in vivo* verhindert (beispielsweise durch bestimmte Hefemutanten), akkumulieren Substrate im ER, die normalerweise exportiert werden (Biederer *et al.*, 1996; Hiller *et al.*,

1996; Shamu *et al.*, 2001). Rodighiero *et al.* fanden jedoch heraus, dass eine Lysin-freie Variante der katalytischen CTA1-Kette, deren N-Terminus blockiert war, immer noch biologisch aktiv war. Daraus zogen sie den Schluss, dass eine Polyubiquitinierung, die als treibende Kraft für den ER-Export gilt (Römisch, 2005), für die Retrotranslokation des Toxins nicht essentiell ist (Rodighiero *et al.*, 2002). Weiterhin konnten sie zeigen, dass sich eine entfaltete A1-Kette *in vitro* spontan zurückfaltet. Ein Sequenzvergleich verschiedener Toxine ergab zudem, dass die toxischen A-Untereinheiten einen sehr geringen Lysin-Gehalt aufweisen, wobei Lysin als Anheftungsstelle für Ubiquitinketten dient (Hazes und Read, 1997). Heiligenstein konnte 2008 in ihrer Dissertation zeigen, dass auch K28 unabhängig vom Ubiquitin/Proteasom-System aus dem ER transloziert wird (Heiligenstein, 2008; Heiligenstein *et al.*, 2006). A/B-Toxine haben somit zwei Strategien entwickelt, ihrer Degradation innerhalb der Wirtszelle zu entgehen. Mit Hilfe eines ER-Retentionssignals gelingt es ihnen, dem Abbau in der Vakuole weitgehend zu entgehen, indem sie einen zellulären Mechanismus ausnutzen, der normalerweise der Rückführung ER-residenter Proteine dient. Dadurch lenken sie ihre Transportroute um und folgen dem Sekretionsweg retrograd über *trans*-Golgi zum ER. Im ER nutzen sie das System der ER-Qualitätskontrolle aus, indem sie sich als fehlgefaltete Proteine tarnen und auf diese Weise als ERAD-Substrate maskiert ins Cytosol transportiert werden. Hier entgehen sie aufgrund der schnellen, spontanen Rückfaltung in ihre native Konformation und aufgrund ihres sehr geringen Lysin-Gehaltes der proteasomalen Degradation, da die nötigen Anheftungsstellen für Ubiquitinmoleküle fehlen (Rodighiero *et al.*, 2002). Wodurch ohne Polyubiquitinierung die treibende Kraft zum ER-Export bereitgestellt wird, ist bis jetzt unklar und Gegenstand aktueller Forschung.

### 3. Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Aus früheren Untersuchungen von Sendzig (2003) ging bereits hervor, dass die plasmidgetriebene Expression eines K28 $\alpha$ -Derivates mit Sekretionssignal in einer sensitiven Hefe einen Suizid-Phänotyp hervorruft, wohingegen die *in vivo* Expression der  $\alpha$ -Untereinheit im Cytosol keinen toxischen Effekt zeigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Erklärung für diese Beobachtung gefunden werden. Es galt, nachzuweisen, ob K28 $\alpha$  alleine im Cytosol einer schnellen Degradation unterliegt oder ob der Eintritt in den Sekretionsweg tatsächlich für die Konversion von K28 $\alpha$  in eine toxische Konformation notwendig ist. Zunächst sollten der ER-Import des Letalkonstruktes nachgewiesen und im Sekretionsweg stattfindende posttranslationale Modifikationen oder Prozessierungen charakterisiert werden, um die Ursache für die Notwendigkeit des ER-Imports für die Zytotoxizität von K28 $\alpha$  aufzuklären. Da ein solches Letalkonstrukt nach Eintritt in den Sekretionsweg einen Selbstkillerphänotyp induziert, muss es einen Weg gefunden haben, aus dem ER zurück in das Cytosol zu gelangen. Somit erlaubt die *in vivo* Expression einer toxischen K28 $\alpha$ -Variante die Aufklärung der retrograden Toxintranslokation durch „Screening“ ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten auf Sensitivitätsänderungen. Anhand dieses Testsystems sollten in der vorliegenden Arbeit weitere Interaktionspartner von K28 $\alpha$  identifiziert und deren Funktion beim ER-Export oder eine Beteiligung am Wirkmechanismus beschrieben werden. Besonderes Augenmerk lag auf der Untersuchung der ERAD-Maschinerie, die von einer Reihe weiterer invasiver A/B-Toxine für deren ER-Export ausgenutzt wird. Ferner sollte auf diese Weise ermittelt werden, inwieweit das Ubiquitin-Proteasom-System für die Cytosol-Dislokation von K28 $\alpha$  von Bedeutung ist.

In einem zweiten Projekt sollte eine Proteomanalyse toxinbehandelter Hefen Aufschluss über die Wirtszellantwort liefern und auf diese Weise weitere Einblicke in den intrazellulären Transport oder den Wirkmechanismus von K28 $\alpha$  gewähren.

## II Material und Methoden

### 1. Verwendete Stämme und Plasmide

#### 1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (Tab. 1) wurden - sofern nicht anders vermerkt - der Stammsammlung des Institutes für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme sowie deren Genotypen und Herkunft.**

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
DH5 $\alpha$	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA3</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(\textit{argF lacZYA})$ U196, $\phi 80\textit{dlacZ}\Delta M15$	(Hanahan,1983)
TOP10F'	<i>F'</i> { <i>lacIq Tn10 (TetR) mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi 80\textit{lacZ}\Delta M15 \Delta\textit{lacX74 recA1 deoR}$ <i>araD139 \Delta(\textit{ara-leu})7697 galU galk</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	pYES2.1 TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit <sup>®</sup> Invitrogen life technologies
TOP10	<i>F'</i> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi 80\textit{lacZ}\Delta M15 \Delta\textit{lacX74 recA1}$ <i>araD139 \Delta(\textit{ara-leu})7697 galU galk</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	TOPO <sup>®</sup> TA Cloning Kit <sup>®</sup> Invitrogen life technologies

## 1.2 Hefestämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Tabelle 2) wurden - sofern nicht anders vermerkt - der Institutstammsammlung entnommen. Deletionsmutanten wurden von der Firma „Open Biosystems“ (Huntsville, USA; <http://www.openbiosystems.com>) bezogen (Tabelle 3).

**Tabelle 2: In der Arbeit verwendete Stämme der Hefe *S. cerevisiae* mit Genotypen und Quellenangaben (relevante Genotypen sind im Fettdruck dargestellt)**

Stamm	Genotyp	Herkunft
192.2d	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2</i>	(Schmitt <i>et al.</i> , 1996)
4492	<i>MAT<math>\alpha</math> pdi1::HIS3 <math>\Delta</math>pcr1 <math>\Delta</math>eng1 <math>\Delta</math>mpd1 <math>\Delta</math>mpd2::G418 ura3 trp1 his3 pBH1800 [MPD1 CEN TRP1]</i>	(Ostergaard <i>et al.</i> , 2001, Nørgaard <i>et al.</i> , 2001, Gillece <i>et al.</i> , 1999)
BJ10242	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52, trp1 leu2-<math>\Delta</math>1 his3-<math>\Delta</math>200 GAL2 KANMX6-pGAL1-HA-PBN1</i>	(Subramanian <i>et al.</i> , 2005)
BJ5410	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52, trp1 leu2-<math>\Delta</math>1 his3-<math>\Delta</math>200 GAL2</i>	(Subramanian <i>et al.</i> , 2005)
BWG1-7a	<i>MAT<math>\alpha</math>, his4-519, ura3-52, ade1-100, leu2-3,-112</i>	(Ye <i>et al.</i> , 2001)
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Open Biosystems
BY4743	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math>; his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0; met15<math>\Delta</math>0/MET15; LYS2/lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i>	Open Biosystems
FGY212	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 lys2<math>\Delta</math>201 <b>shr3<math>\Delta</math>6</b></i>	(Kota <i>et al.</i> , 2007)
FGY219	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 lys2<math>\Delta</math>201 <b>pep4<math>\Delta</math>shr3<math>\Delta</math>6</b></i>	(Kota <i>et al.</i> , 2007)
JKY29	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 lys2<math>\Delta</math>201 <b>shr3<math>\Delta</math>6</b> <b>doa10<math>\Delta</math>::natMX4</b></i>	(Kota <i>et al.</i> , 2007)

Stamm	Genotyp	Herkunft
KHY306	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>sec12-4</i> , <i>vph1<math>\Delta</math>::LEU2</i> , <i>prc1-1</i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>ade2.101</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i>	(Haynes <i>et al.</i> , 2002)
M4492	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>pdi1::HIS3 <math>\Delta</math>prc1 <math>\Delta</math>eng1 <math>\Delta</math>mpd1</i> <i><math>\Delta</math>mpd2::G418 ura3 trp1 his3</i> <i>pBH1800 [MPD1 CEN TRP1]</i>	(Ostergaard <i>et al.</i> , 2001, Nørgaard <i>et al.</i> , 2001, Gillece <i>et al.</i> , 1999)
ME598	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>bar1 leu2-3,112 gal2 ura3</i> <i>kex2::ura3</i>	(Egel-Mitani <i>et al.</i> , 1990)
MS10	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura 3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ade2-101</i>	(Kabani <i>et al.</i> , 2003)
MS1111	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura 3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ade2-</i> <i>101</i> , <b><i>kar2-1</i></b>	(Kabani <i>et al.</i> , 2003)
MS193	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura 3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ade2-</i> <i>101</i> , <b><i>kar2-133</i></b>	(Kabani <i>et al.</i> , 2003)
MS300b	<i>K28-Superkiller</i>	Stammsammlung
PLY127	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>ura3-52 lys2<math>\Delta</math>201</i> <i>WT zu FGY212, FGY219, JKY29</i>	P.O. Ljungdahl
PM373	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <b><i>ufd1-1</i></b> , <i>his4-519</i> , <i>ura3-52</i> , <i>ade1-100</i> , <i>leu2-3,-112</i>	(Ye <i>et al.</i> , 2001)
RSY255	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>leu2-3,-112</i> , <i>ura3-52</i>	(Stirling <i>et al.</i> 1992)
RSY281	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <b><i>sec23-1</i></b>	(Hicke <i>et al.</i> , 1992)
RSY524	<i>MAT a leu2-3,112 ade2 ura3-52</i> <i>pep4-2 SUC2 sec61-2</i>	R. Schekman
RSY1132	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2,3-112</i> , <i>ura3-52</i> , <b><i>sec61-3</i></b>	(Stirling <i>et al.</i> , 1992)
RSY2022	<i>MAT<math>\alpha</math></i> <i>SEC61::HIS3 ade2-1 can100</i> <i>his3-11,15 leu2-3 trp1-<math>\Delta</math>1 ura3-3</i> <i>[pSEC61(CEN/LEU), pMZ11 (UPRE-</i> <i>lacZ CEN/TRP)]</i>	(Brodsky and Schekman, 1993)

Stamm	Genotyp	Herkunft
S86c	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1(called S86)K+(verml.K1)[L]/[M] heat-cured S86;[L]/[M-0]</i>	Schmitt und Tipper, 1990
SEY6210	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 lys2-801 suc2-<math>\Delta</math>9</i>	(Robinson et al. 1988)
SNY1026-7A	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>jem1::LEU2 <math>\Delta</math>scj1::TRP1 ura3 leu2 trp1 his3 lys2 suc2</i>	(Nishikawa et al., 2001)
TM230	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 his3 hog1::URA3</i>	H. Saito (Boston)
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 ade2 trp1 leu2 his3 can1</i>	(Gillece et al., 1999)
WCG4	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, his3-11, 15 leu2-3, 112</i>	(Heinemeyer et al., 1991; 1993)
WCG4-11a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, his3-11, 15 leu2-3, 112, <b>pre1-1</b></i>	(Heinemeyer et al., 1991; 1993)
WCG4-22a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3, his3-11, 15 leu2-3, 112, <b>pre2-2</b></i>	(Heinemeyer et al., 1991; 1993)
WPY106	<i>MAT<math>\alpha</math>, <b>cdc48-3</b>, ura3-52, leu2-3</i>	Ye et al., 2003
YTX237	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>ubc1::HIS3 ubc7::LEU2 prc1-1 trp1-1(am) his3-<math>\Delta</math>200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	Stammsammlung
YTX233	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>ubc1::HIS3 <math>\Delta</math>hrd1::TRP1 prc1-1 trp1-1(am) his3-<math>\Delta</math>200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	Stammsammlung
YTX234	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>ubc7::LEU2 <math>\Delta</math>hrd1::TRP1 prc1-1 trp1-1(am) his3-<math>\Delta</math>200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	Stammsammlung
YW01	<i>MAT<math>\alpha</math> prc1-1 trp1-1(am) his3-<math>\Delta</math>200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	W. Seufert
YWO13	<i>MAT<math>\alpha</math>, <b>ubc4::HIS3</b></i>	W. Seufert

**Tabelle 3: Verwendete Hefe-Deletionsmutanten.** Die aufgeführten Nullmutanten der Hefe (Open Biosystems) wurden zur Bestimmung der Lokalisation und des intrazellulären Transports von K28pre-pro- $\alpha^R$  eingesetzt (Wildtyp zu den verwendeten Stämmen: *S. cerevisiae* BY4742 bzw. BY4743).

ORF	Deletiertes Gen
YFL025C	<i>BST1</i>
YAL058W	<i>CNE1</i>
YMR264W	<i>CUE1</i>
YBR201W	<i>DER1</i>
YDR069C	<i>DOA4</i>
YIL030C	<i>DOA10, SSM4</i>
YMR276W	<i>DSK2</i>
YNL258C	<i>DSL1</i>
YGL200C	<i>EMP24</i>
YLR080W	<i>EMP46</i>
YGR284C	<i>ERV29</i>
YML067C	<i>ERV41</i>
YAL042W	<i>ERV46</i>
YMR255W	<i>GFD1</i>
YMR161W	<i>HLJ1</i>
YOL013C	<i>HRD1, DER3</i>
YLR207W	<i>HRD3</i>
YBR072W	<i>HSP26</i>
YHR204W	<i>HTM1, MNL1</i>
YGL203C	<i>KEX1</i>
YNL238W	<i>KEX2</i>
YKL073W	<i>LHS1</i>
YBR170C	<i>NPL4</i>
YAR002W	<i>NUP60</i>

ORF	Deletiertes Gen
YDL116W	<i>NUP84</i>
YGL006W	<i>PMC1</i>
YGL167C	<i>PMR1</i>
YEL037C	<i>RAD23</i>
YCL001W	<i>RER1</i>
YFR051C	<i>RET2</i>
YIL076W	<i>SEC28</i>
YBR171W	<i>SEC71</i>
YLR292C	<i>SEC72</i>
YJR010C-A	<i>SPC1</i>
YML055W	<i>SPC2</i>
YAL005C	<i>SSA1</i>
YBL075C	<i>SSA3</i>
YDL229W	<i>SSB1</i>
YER100W	<i>UBC6, DOA2</i>
YMR022W	<i>UBC7</i>
YML013W	<i>UBX2, SEL1</i>
	<i>UFD2</i>
YML029W	<i>USA1</i>
YDL128W	<i>VCX1</i>
YNL064C	<i>YDJ1</i>
YDR057W	<i>YOS9</i>
YOR087W	<i>YVC1</i>

## **2 Kultivierung**

### **2.1 Kulturbedingungen**

#### **2.1.1 *Escherichia coli***

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf LB<sub>Amp</sub>-Platten im Brutschrank bei 37°C. Nach Überimpfen der Kolonien in LB-Flüssigmedium erfolgte die Kultivierung auf einem Rundschüttler bei 220 Upm und 37°C. Bei plasmidhaltigen *E. coli*-Stämmen wurde den Medien das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin in einer Endkonzentration von 50-100 µg/ml, Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml) zugegeben.

#### **2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis***

Die Anzucht von Hefen erfolgte in YEPD- oder entsprechendem d/o-Flüssigmedium bei 30°C und 220 Upm. YEPD- bzw. entsprechende d/o-Agarplatten wurden bei 30°C im Brutschrank inkubiert. MBA-Platten zur Bestimmung der Toxinsensitivität der eingebetteten Hefestämme wurden drei Tage bei 20°C inkubiert.

### **2.2 Kryokulturen**

Kryokulturen dienen der langfristigen Lagerung von Hefe- oder Bakterienstämmen und sind über Jahre hinweg bei -80 °C haltbar. Zum Anfertigen einer Dauerkultur wurde ein Milliliter einer frischen Übernacht-Kultur 1:1 mit 99 %-igem, sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -80 °C gelagert.

## 2.3 Nährmedien

### LB-Medium

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

Zur Herstellung von festem Medium wurden 1,5 % Agar hinzugefügt.

Zur Selektion von Klonen, die Plasmide mit Ampicillin-Resistenzmarker enthielten, wurden 15 µl einer Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml in 50 % Ethanol) zu 7 ml Flüssigmedium gegeben bzw. 40 µl Stammlösung je LB-Platte ausplattiert.

### YEPD-Medium

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

Zur Herstellung von festem Medium wurden 1,5 % Agar hinzugefügt.

### YPCCa

Hefeextrakt	10 g/L
Pepton	2,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
Zitronensäure	2,1 g/L
Glukose	20 g/L
CaCl <sub>2</sub>	5,55 g/L

Der pH-Wert wurde auf 4,7 eingestellt. Glukose und CaCl<sub>2</sub> wurden jeweils getrennt autoklaviert und die Lösungen später vereint.

### „Drop-out“-Medium

Lösung A:	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L
	d/o-Mix	0,87 g/L
	ad 350 ml Aqua dest.	

Lösung B:            Glukose/Galaktose/Raffinose    20 g/L  
                          (Agar    15 g/L  
                          ad 700 ml Aqua dest.

Lösung C:            YNB w/o „amino acids”            1,7 g/L  
                          ad 50 ml Aqua dest.

Lösungen A und B wurden getrennt autoklaviert, um bei pH 4,7 eine Säurehydrolyse des Agars zu vermeiden. Zur Expression von Genen, die unter der Kontrolle von *GAL*-Promotoren standen, wurde dem Medium Galaktose zugegeben. Raffinose wurde bei der Anzucht von Hefen zugesetzt, bei denen eine Katabolitrepression vermieden werden sollte. Lösung C wurde sterilfiltriert. Nach Abkühlung der Lösungen auf 60°C wurden diese vereinigt.

Minimal-Methylenblau-Agar (MBA)

Lösung A:            AS-Stammlösung                    100 ml  
                          Zitronensäure                    19,2 g/L  
                          (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                         5 g/L  
                          Methylenblau                    0,003 %  
                          ad 550 ml Aqua dest.

Lösung B:            Glukose                                20 g/L  
                          Agar                                    16 %  
                          ad 400 ml Aqua dest.

Lösung C:            YNB w/o „amino acids”            1,7 g/L  
                          ad 50 ml Aqua dest.

Zur Herstellung von MBA pH 4,7 für Killertoxin K28 wurde der pH-Wert von Lösung A mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eingestellt. Lösungen A und B wurden getrennt autoklaviert, um bei pH 4,7 eine Säurehydrolyse des Agars zu vermeiden. Lösung C wurde sterilfiltriert. Nach Abkühlung der Lösungen auf 50°C wurden diese vereinigt und zu 15 ml in sterile Reagenzgläser aliquotiert.

10x „drop-out“-Mix

Adenin, Uracil, Tryptophan, Histidin, Arginin, Methionin	je 0,2 g/L
Tyrosin, Lysin, Isoleucin	je 0,3 g/L
Phenylalanin	0,5 g/L
Leucin, Aspartat	je 1 g/L
Threonin	2 g/L
Valin	1,5 g/L

Um ein dem Genotyp der zu transformierenden Hefe entsprechendes Selektionsmedium herzustellen, wurde(n) die jeweilige(n) Aminosäure(n) weggelassen.

B-Medium

Lösung 1:	Glukose/Galaktose	50 g
	Aqua dest.	ad 180 ml
Lösung 2:		
	Malat (Äpfelsäure)	20 g
	Tri-Natriumcitrat	0,5 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 g
	MgSO <sub>4</sub>	1,0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
	Inosit	0,04 g
	AS-Stammlösung (10x)	100 ml
	Spurenelement-Stammlösung (100x)	10 ml
	Vitamin-Stammlösung (100x)	10 ml
	Aqua dest.	ad 700 ml

Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 4,7 eingestellt. Die Lösungen 1 und 2 wurden getrennt autoklaviert.

10x Aminosäure-Lösung (L-Form)

Alanin	0,75 g/L
Argininmonohydrochlorid	3,5 g/L
Asparaginsäure	0,5 g/L
Glutaminsäure	3,0 g/L
Histidinmonochlorid	0,2 g/L
Methionin	0,4 g/L
Serin	0,4 g/L
Threonin	2,0 g/L
Tryptophan	0,4 g/L

100x Spurenelement-Stammlösung

Borsäure	200 mg/L
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	200 mg/L
AlCl <sub>3</sub>	200 mg/L
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	100 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 mg/L
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	100 mg/L
KI	100 mg/L
Kaliumhydrogentartrat	2 g/L

100x Vitamin-Stammlösung

4-Aminobenzoessäure	20 mg/L
Biotin	20 mg/L
Folsäure	20 mg/L
Nicotinsäure	100 mg/L
Riboflavin	50 mg/L
Thiaminiumdichlorid	50 mg/L
Ca-D-Panthothenat	100 mg/L

Die drei Stammlösungen wurden 20 min im strömenden Dampf sterilisiert und anschließend dem B-Medium zugefügt.

### SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Pepton	2,0 %
NaCl	10 mM
Glukose	20 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	2,5 mM

Der Hefeextrakt wurde mit Pepton und NaCl in H<sub>2</sub>O dest gelöst. Eine vorbereitete 250 mM KCl-Stammlösung wurde 1:10 verdünnt zu den bereits gelösten Substanzen gegeben. Die Einstellung auf pH 7,0 erfolgte mit 5 N NaOH. Nach dem Autoklavieren und der Abkühlung wurde die Glukoselösung dazugegeben sowie die entsprechende Menge einer sterilfiltrierten 2 M MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung.

## **3 Molekularbiologische Methoden**

### **3.1 Plasmide**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren wurden entweder im Rahmen dieser Arbeit hergestellt oder der Plasmid-Stammsammlung des Institutes entnommen (Tabelle 4). Eine kurze Übersicht über die verwendeten Vektoren liefert die Abbildung 2, eine detailliertere Beschreibung erfolgt im Ergebnisteil.

**Tabelle 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete und neu hergestellte Plasmide.** Konstrukte, die im Hefeexpressions-Vektor pYES2.1-TOPO einkloniert vorliegen, besitzen an ihrem 5'-Ende Schnittstellen für *XhoI* und *EcoRI* und am 3'-Ende für *BglII*, *HindIII* und *SalI*

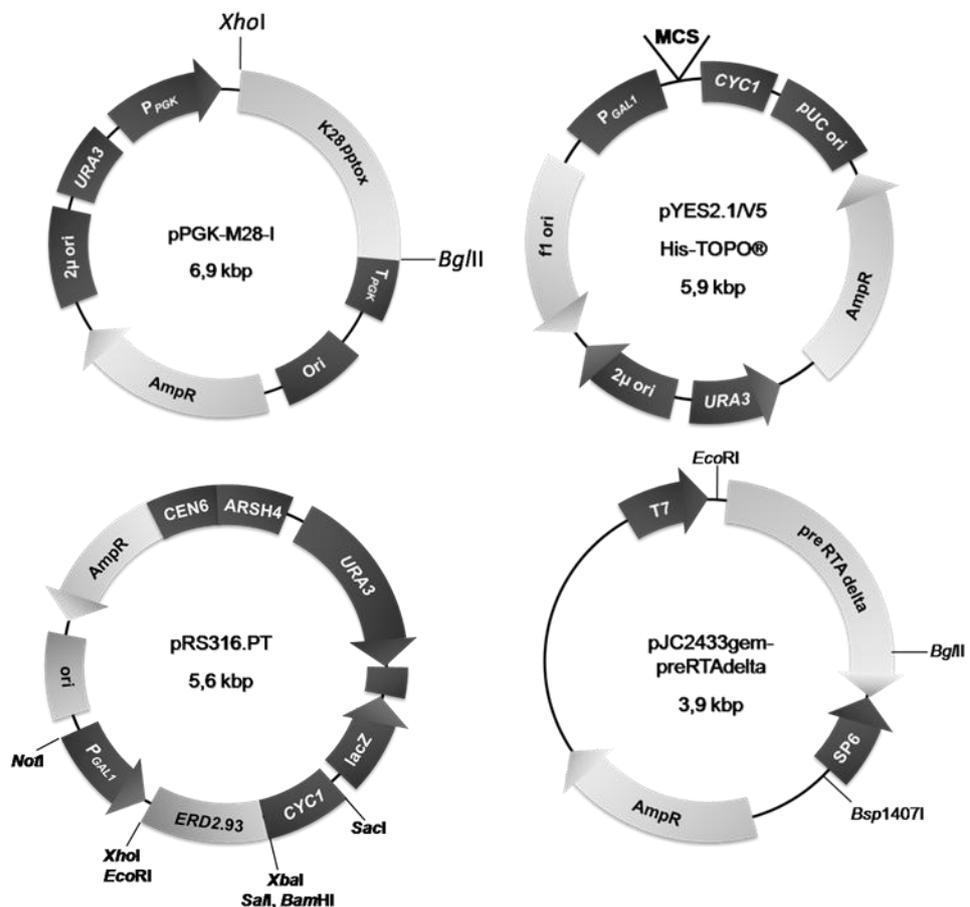
Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pYES2.1/V5-His-TOPO	5,9	Hefeexpressionsvektor mit GAL 1-Promotor, TA-Klonierung von PCR-Produkten, Amp <sup>R</sup> -Gen, C-terminales V5-Epitop und His-Tag	®Invitrogen
pPGK-M28-I	6,9	pDT-PGK mit <i>XhoI/BglII</i> Fragment, enthält den K28-ORF	(Schmitt, 1995)
pYES/K28 α <sup>R</sup>	6,2	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest	(Sendzik, 2003)
pYES/K28 pptox	6,9	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-ORF	(Sendzik, 2003)
pYES/K28 SS-pro-α <sup>R</sup>	6,4	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Arginin-Rest	(Sendzik, 2003)
pYES/K28 SS-pro-α	6,4	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz ohne C-terminalem Arginin-Rest	(Sendzik, 2003)
pYES/K28 SS-pro-α <sup>R</sup> K-0	6,4	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Arginin-Rest alle Lys-Reste durch Arg ersetzt	(Sendzik, 2006)
pYES/K28pro-α <sup>R</sup>	6,2	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest; ohne Signalsequenz	Diese Arbeit

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pYES/K28 SS- $\alpha^R$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest und Signalsequenz; ohne pro-Region	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro-FLAG- $\alpha^R$	6,4	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest und Signalsequenz FLAG-tag vor Alpha-Untereinheit	Diese Arbeit
pYES/K28 pro-FLAG- $\alpha^R$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest und FLAG-tag vor Alpha-Untereinheit ohne Signalsequenz	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-FLAG- $\alpha^R$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest und FLAG-tag vor Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz, ohne pro-Region	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro-V5- $\alpha^R$	6,4	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest und Signalsequenz V5-tag vor Alpha-Untereinheit	(Nico Schäuble, 2007)
pYES/K28 pro-V5- $\alpha^R$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest, ohne Signalsequenz, V5-tag vor Alpha-Untereinheit	(Nico Schäuble, 2007)

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pYES/K28 V5- $\alpha^R$	6,2	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit C-terminalem Arginin-Rest, ohne Signalsequenz und pro-Region, V5-tag vor Alpha-Untereinheit	Nico Schäuble, 2007
pYES/K28 SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ delta Kex2	6,4	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz, C-terminalem Arginin-Rest und FLAG-tag vor der Alpha-Untereinheit, mit zerstörter Kex2p-Schnittstelle: (Arg <sup>49</sup> →Ala <sup>49</sup> )	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^R$ delta Kex2	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz, C-terminalem Arginin-Rest, mit zerstörter Kex2p-Schnittstelle (Arg <sup>49</sup> →Ala <sup>49</sup> )	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^{HDEL}$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz, C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^{HDELR}$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz, C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL, maskiert durch C-terminalen Arginin-Rest	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^K$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Lysin-Rest	Diese Arbeit

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^H$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Histidin-Rest	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^L$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Leucin-Rest	Diese Arbeit
pYES/K28 SS-pro- $\alpha^D$	6,3	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit K28-Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Aspartat-Rest	Diese Arbeit
pGEM/ $\alpha^R$	4,2	Alpha-Untereinheit mit C-terminalem R über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i> in pGEM-JC kloniert	Diese Arbeit
pGEM/ SS-pro- $\alpha^R$	4,4	Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem R über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i> in pGEM-JC kloniert	Diese Arbeit
pRS316PT/ SS-pro- $\alpha^R$	6,1	Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz über <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i> in pRS316PT kloniert; unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors	Diese Arbeit
YEp351.PT/ SS-pro- $\alpha^R$	6,8	Alpha-Untereinheit mit Signalsequenz und C-terminalem Arginin-Rest über <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i> in YEp351PT kloniert	Diese Arbeit

Plasmid	Größe (kb)	Eigenschaften	Herkunft
pYES/ Erd2cmyc	6,6	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> mit myc-getaggtter Variante des HDEL-Rezeptors Erd2p	Julia Dausend
pW021		2 $\mu$ -Vektor, enthält das Ubiquitin-Gen aus <i>S. cerevisiae</i> mit Lys/Arg-Austausch an Position 48 + 63 unter der Kontrolle des induzierbaren <i>CUP1</i> -Promotors <i>TRP1</i> -Marker, Amp <sup>R</sup>	Dieter Wolf



**Abbildung 2: Schematische Vektorkarten der verwendeten Klonierungsvektoren.** Der Vektor pPGK-M28-I, der die kodierende Sequenz des K28-Präprotoxins enthält, diente als Template zur Amplifikation der Toxin-Derivate. Der zur TOPO-Klonierung eingesetzte „Shuttle“-Vektor pYES-2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> ermöglicht die regulierte Expression einklonierter Konstrukte (*GAL1*-Promotor) und erlaubt die direkte Sequenzierung der Inserts mit Hilfe kommerziell erhältlicher V5- und *GAL1*-spezifischer Primer. Der Centromer-vektor pRS316PT ist ein „low copy“ Vektor, der stabil weitervererbt wird, so dass alle Nachkommen dieselbe Kopienzahl besitzen. Der modifizierte pGEM1-Vektor pJC2433gem-preRTAdelta wurde zur *in vitro* Transkription der beiden Toxinvarianten  $\alpha^R$  und SS-pro- $\alpha^R$  eingesetzt.

## 3.2 Oligonukleotide

### 3.2.1 Primer

**Tabelle 5: Auflistung der zur PCR eingesetzten Oligonukleotidprimer.** Die Sequenzangabe erfolgt jeweils in 5'-3'-Orientierung. Start- und Stopp-Kodons sind fettgedruckt dargestellt, Schnittstellen sind hellgrau hinterlegt und FLAG- bzw. V5-tag-Sequenzen dunkelgrau.

Primer		Sequenz (5' → 3')	Verwendung
1	5' K28 (pre) (T. Sendzig)	CTCGAG GAA TTC <b>ATG</b> GAGAG CGTTTCCTCATTATTTAACATTT TTTC	Klonierungsprimer für K28-Konstrukte
2	5' K28pro	<b>CTC GAG</b> GAA TTC <b>ATG</b> CCGAC ATCTGAGGACAGCAGGG	Klonierungsprimer für cytosolische K28- Konstrukte
3	3' K28alphaR (T. Sendzig)	<b>AGA TCT</b> <b>GTC GAC</b> <b>AAG CTTT</b> <b>TA</b> ACGCGATTGTATATTCTCTGCGT TTTCAGTC	Klonierungsprimer für K28 SS-pro- $\alpha^R$ und pro- $\alpha^R$
4	3' K28alpha (T. Sendzig)	<b>AGA TCT</b> <b>GTC GAC</b> <b>AAG CTTT</b> <b>TA</b> CGATTGTATATTCTCTGCGTTTTTC AGTG	Klonierungsprimer für K28 SS-pro- $\alpha$
5	5' prea SP2	GTTAGTTCTAGCACTATTAAGTG TTTCAAATCTCAAATATGCACGG GGTGACTTCAG	Klonierungsprimer für SS- $\alpha$ ; „annealed“ im 3'-Bereich von SS & im 5'-Bereich von $\alpha$
6	5' K28alpha/ FLAG/3'pro	TTAGAAGAACGT <b>GATTACAAGGA</b> <b>TGATGATGATAAG</b> GACTTC AG TGCTGCTACTTGCGTACTGATG	5' SOE-Primer für K28-pre-pro- <b>FLAG</b> - $\alpha^R$
7	3'K28pro/ FLAG/5'K28 alpha	CACTGAAGTC <b>CTTATCATCATCA</b> <b>TCCTTGTAATC</b> ACGTTCTTCTAA GCCCTGCTGTCTCTCAG	3' SOE-Primer für K28-SS-pro- <b>FLAG</b> - $\alpha^R$
8	5' K28FLAG SP1	CTCGAG <b>GAATTC</b> <b>ATGG</b> GAGAGC GTTTCCTCATTATTTAACATTTTT TCAACAATCATGGTAACTATAAAA TCGTTAGTTCTAGCACTATTAA GTGTTTCAAATCTC	Klonierungsprimer für K28-SS- $\alpha$ und K28- SS-Flag- $\alpha$ ; „annealed“ im 5'-Bereich von SS

Primer		Sequenz (5' → 3')	Verwendung
9	5' K28FLAG alpha/5'K28 SP2	CGTTAGTTCTAGCACTATTAAGT GTTTCAAATCTCAAATATGCACG GGGT <b>GATTACAAGGATGATGATG</b> <b>ATAAG</b> GACTTCAGTG	Klonierungsprimer für K28-SS-Flag- $\alpha$ ; aus aus 3'-Bereich von SS, Sequenz von FLAG und 5'-Bereich von $\alpha$
10	5' K28alpha/ FLAG/3'K28 pro R <sup>49</sup> → A <sup>49</sup>	TTAGAAGA <b>AGCT</b> <b>GATTACAAGAT</b> <b>GATGATGATAAG</b> GACTTCAGTGC TGCTACTTGCGTACTGATG	5' SOE-Primer für K28-SS-pro- <b>FLAG</b> - $\alpha^R$ mit zerstörter Kex2p- Schnittstelle
11	3'K28pro/ FLAG/5'K28 alpha R <sup>49</sup> → R <sup>49</sup>	CACTGAAGTC <b>CTTATCATCATCAT</b> <b>CCTTGTAATCAGCT</b> TCTTCTAGCC CTGCTGTCTCTCAG	3' SOE-Primer für K28-SS-pro- <b>FLAG</b> - $\alpha^R$ mit zerstörter Kex2p- Schnittstelle
12	5' K28 deltakex2	CTGAGAGACAGCAGGGCTTAGAA GAAGCTGACTTCAGTGCTGCTAC TTGCGTACTGATG	5' SOE-Primer für K28-SS-pro- $\alpha^R$ mit zerstörter Kex2p- Schnittstelle
13	3' K28 deltakex2	CATCAGTACGCAAGTAGCAGCAC TGAAGTCAGCTTCTTCTAAGCCC TGCTGTCTCTCAG	3' SOE-Primer für K28-SS-pro- $\alpha^R$ mit zerstörter Kex2p- Schnittstelle
14	5' V5alpha/ XhoI-EcoRI	<b>CTCGAG GAATTCATGGGTAAGC</b> <b>CTATCCCTAACCCTCTCCTCGGT</b> <b>CTCGATTCTACG</b> GACTTCAGTGC TGCTACTTGC	Klonierungsprimer für <b>V5</b> -K28 $\alpha^R$
15	5' V5- K28alpha	<b>GGTAAGCCTATCCCTAACCCTCT</b> <b>CCTCGGTCTCGATTCTACG</b> GACT TCAGTGCTGCTACTTGC	5' SOE-Primer für K28-SS-pro- <b>V5</b> - $\alpha^R$ und pro- <b>V5</b> - $\alpha^R$
16	3' proV5	<b>CGTAGAATCGAGACCGAGGAGA</b> <b>GGGTTAGGGATAGGCTTACC</b> ACG TTCTTCTAAGCCCTGCTG	3' SOE-Primer für K28-SS-pro- <b>V5</b> - $\alpha^R$ und pro- <b>V5</b> - $\alpha^R$
17	3' K28alpha HDEL	<b>AGATCT</b> <b>GTCGAC</b> <b>AAGCTT</b> <b>TTA</b> <b>TAATTCGTCGTGCGATTGTATATT</b> CTCTGCGTTTTTCAGTC	Klonierungsprimer für K28-SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL}}$

Primer		Sequenz (5' → 3')	Verwendung
18	3' K28alpha HDEL <u>R</u>	AGATCT GTCGAC AAGCTT TTA ACGTAATTCGTCGTGCGATTGTA TATTCTCTGCGTTTTTCAGTC	Klonierungsprimer für K28-SS-pro-α <sup>HDEL<sub>R</sub></sup>
19	3' K28aK	AGATCT GTCGAC AAGCTT TTA CTTCGATTGTATATTCTCTGCGTT TTCAG	Klonierungsprimer für K28-SS-pro-α <sup>K</sup>
20	3' K28aH	AGATCT GTCGAC AAGCTT TTA GTGCGATTGTATATTCTCTGCGTT TTC	Klonierungsprimer für K28-SS-pro-α <sup>H</sup>
21	3' K28aL	AGATCT GTCGAC AAGCTT TTA TAGCGATTGTATATTCTCTGCGTT TTC	Klonierungsprimer für K28-SS-pro-α <sup>L</sup>
22	3' ppaD	AGATCT GTCGAC AAGCTT TTA GTCCGATTGTATATTCTCTGCGTT TTC	Klonierungsprimer für K28-SS-pro-α <sup>D</sup>

### 3.3 DNA-Isolierungsmethoden

#### 3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

##### 3.3.1.1 Alkalische Lyse

###### GTE-Lösung

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

###### NaOH/SDS-Lösung

NaOH	0,8 g
SDS	1 g

ad 100 ml Aqua dest.

### 5 M Kaliumacetat-Lösung

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

Die alkalische Lyse stellt eine elegante Technik zur Plasmid-Präparation dar, mit deren Hilfe die genomische DNA der Bakterien effektiv entfernt wird. Aufgrund des stark alkalischen pH-Wertes denaturiert die DNA. Anschließend bewirkt die Kaliumacetat-Lösung eine rasche Renaturierung der Plasmid-DNA, wohingegen die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Asubel *et al.* (1995). Zunächst wurden 1,5 ml einer frischen Bakterienkultur sedimentiert und das Pellet in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl NaOH-SDS. Zur Neutralisation wurden 150 µl Kaliumacetat (pH 4,8) zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Mittels 3-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden Zelltrümmer, Proteine sowie chromosomale DNA entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit 800 µl Ethanol (100 %) versetzt, gut gemischt und nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA 1 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Die getrocknete DNA wurde in 20 µl Aqua dest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **3.3.1.2 Plasmid-Mini-Kit**

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA, die frei von RNA ist, wurde das „E.Z.N.A. Plasmid Minipräp-Kit II“ der Firma PeqLab eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Diese Methode zur Plasmidisolierung basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit nachfolgender selektiver Adsorption der Plasmid-DNA an einer Silikamembran. In mehreren Waschschrinen wird die Plasmid-DNA von

Protein- und RNA-Verunreinigungen befreit. Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden spektralphotometrisch mittels „GeneQuant“ (Amersham Pharmacia Biotech) durch Messung der Adsorption bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten bestimmt.

### **3.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen kam das „Perfectprep Gel Cleanup Kit“ der Firma Eppendorf zum Einsatz. Die Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die hier angewandte Methode nutzt die Tatsache, dass Silika-Material in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze DNA bindet. Das hier benutzte Kit bedient sich einer Säule mit Glasfasermembran, an welche die Nukleinsäuren reversibel adsorbieren. Letztere können nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer durch Lösungen geringer Salzkonzentrationen (H<sub>2</sub>O oder TE) eluiert werden.

## **3.4 Transformationstechniken**

### **3.4.1 Elektroporation von *E. coli***

Nach einem Protokoll von Calvin und Hanawalt (1988) und Dower *et al.* (1988) werden mit Hilfe kurzer elektrischer Impulse hoher Frequenz Poren in der Zellmembran erzeugt. Auf diese Weise werden sowohl pro- als auch eukaryotische Zellen durchlässig für hochmolekulare Moleküle wie DNA-Plasmide. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 300 ml LB-Medium mit *E. coli* DH5 $\alpha$  1 %-ig beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>586</sub> von 0,5 bis 0,7 angezogen. Die Zellen wurden 10 min bei 6.000 Upm und 4°C geerntet und das Pellet zweimal in jeweils 100 ml gekühltem Glycerin (10 % v/v) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde 4 min bei 8.000 Upm sedimentiert.



### PEG-Lösung

10x Lithiumacetat pH 7,5	1 Teil
10x TE	1 Teil
50% PEG4000	8 Teile

Die Lithiumacetat-Methode zur Transformation von *S. cerevisiae* beruht auf der Beobachtung, dass alkalische Kationen intakte Hefezellen zur Aufnahme von DNA befähigen (Ito *et al.*, 1983). Schiestl und Gietz beschrieben, dass die Nutzung einzelsträngiger Nukleinsäuren als „Carrier“ die Kompetenz von Hefezellen zur Aufnahme von DNA stark erhöht (Schiestl und Gietz, 1989, Gietz und Schiestl, 1991). Zur Transformation wurde jeweils 1 ml einer frischen, in YEPD-Medium 1%-ig beimpften üN-Kultur des entsprechenden Hefestammes eingesetzt. Dazu wurden die Zellen geerntet (5 min, 8.000 Upm, RT), in 1 ml LiAc/TE-Lösung gewaschen und das Zellpellet anschließend in 100 µl LiAc/TE-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 1-3 µg Plasmid-DNA, 20 µl hitzedenaturierter „Carrier-DNA“ (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml) und 600 µl frisch hergestellter PEG-Lösung versetzt und 45 min bei 30°C auf dem Rundschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA-Aufnahme durch einen 15-minütigen Hitzeschock bei 42°C induziert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 500 µl 1xTE-Puffer gewaschen und in 200 µl 1xTE-Puffer aufgenommen. Die transformierten Hefen wurden auf geeignete Selektionsmedien ausplattiert und drei Tage bei 30°C inkubiert.

### **3.5 Restriktion von Plasmid-DNA**

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer Sequenzen aus vier bis acht Basenpaaren in einem DNA-Doppelstrang zu spalten. In der Molekularbiologie kommen hauptsächlich Typ-II-Restriktionsenzyme zum Einsatz. Der Restriktionsverdau erlaubt die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Restriktion stets in 20 µl Ansätzen unter Verwendung von Enzymen und Puffern der Firmen Roche bzw. Fermentas nach Anleitung des entsprechenden Herstellers. Mittels alkalischer Lyse gewonnene Plasmid-DNA wurde bei 37°C maximal 1,5 h verdaut.

### **3.6 Agarosegelelektrophorese**

#### TBE-Puffer (10x)

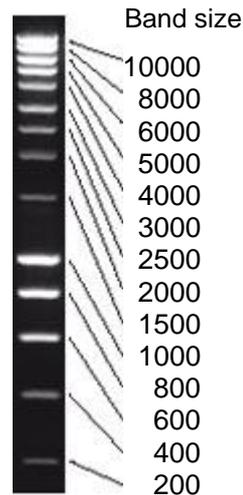
Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

#### GLB-Puffer

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

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld dar. Die ionisierten Phosphatgruppen der DNA- und RNA-Moleküle verleihen den Nukleinsäuren eine negative Nettoladung, wodurch diese im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt neben der Nettoladung von Größe und Konformation der Moleküle ab. Weiter beeinflussen die elektrische Feldstärke, die Porengröße der Matrix sowie die Pufferzusammensetzung die Wanderungsgeschwindigkeit.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte nach einer Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) in einem 1 %-igen Agarosegel in TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm. Zur Markierung der Lauffront wurden die Proben mit 1/5 Volumen GLB versetzt. Der DNA-Längenstandard „smart-ladder“ der Firma Eurogentec wurde zur Bestimmung der Fragmentgrößen mitgeführt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Fragmentgrößen des DNA-Längenstandards „Smart Ladder“ der Firma Eurogentec**

Zur Detektion der Nukleinsäure-Banden wurde das Gel mit der DNA-interkalierenden Substanz Ethidiumbromid (25 mg/l) gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem „ChemiDoc-XRS-System“ und der Analyse Software „Quantity One 4.6.2“ (Fa. Biorad).

### 3.7 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren in einer ATP- oder NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und freien 3'-Hydroxylgruppen und ermöglichen so die Klonierung von DNA in einen zuvor linearisierten Vektor. Einsatz fand die T4-DNA-Ligase der Firma Applichem zur „sticky-end“ Ligation linearisierter Vektor-DNA mit dem zu klonierenden DNA-Fragment. Zu 100 ng linearisiertem Vektor wurden 1 U der Ligase sowie 2 µl

10x Ligationspuffer hinzugefügt. Die einzusetzende Menge an Insert-DNA konnte mittels folgender Formel berechnet werden, wobei stets ein Insert:Vektor-Verhältnis von 3:1 gewählt wurde:

$$\text{Insertmenge [ng]} = \frac{\text{Vektormenge [ng]} \times \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} \times \text{Insert/Vektor-Verhältnis}$$

Die Ligationsansätze wurden mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und üN bei 14-16 °C in einem Thermomixer 5436 inkubiert. Um den Salzgehalt zu verringern, wurden die Ansätze vor der Transformation dialysiert. Hierzu wurden sie auf einen 0,025 µm-Dialysefilter (Firma Millipore) pipettiert und eine Stunde gegen 10 %-iges (v/v) Glycerin in einer Petrischale dialysiert. Zur Elektroporation in kompetente DH5α-Zellen wurde der komplette Ligationsansatz eingesetzt. Das Ausplattieren erfolgte auf LB-Platten mit dem für die Selektion des Vektors entsprechenden Antibiotikum.

### 3.8 PCR („Polymerase chain reaction“)

Die Methode der PCR als ein *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation ausgewählter Nukleinsäureabschnitte wurde 1983 von Kary B. Mullis entwickelt und macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zu Nutze, DNA zu duplizieren (Mullis K.B. *et al.* 1986, Mullis, K.B., 1990). Voraussetzung für die Initiation dieses Prozesses sind kurze, synthetisch hergestellte, einzelsträngige Oligonukleotide, sogenannte Primer, die komplementär an die gewünschten, zuvor denaturierten DNA-Sequenzen binden. Ausgehend von deren freiem 3'-OH-Ende kann eine thermostabile DNA-Polymerase die Amplifikation des Zweitstrangs in 5' → 3'-Richtung starten.

Die PCR besteht im Allgemeinen aus einer unterschiedlichen Anzahl von Zyklen mit verschiedenen Temperaturen. Jeder Zyklus umfasst dabei drei Phasen. Die erste Phase, die Denaturierung, verläuft bei 94-95 °C und bewirkt die Trennung des DNA-Doppelstranges zu DNA-Einzelsträngen, so dass sich die Primer in einem zweiten Schritt bei ihrer jeweiligen, spezifischen „Annealing“-Temperatur an die

denaturierende DNA anlagern können (Saiki *et al.*, 1988). Anschließend erfolgt bei 68-74°C (abhängig vom Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase) die Neusynthese („Elongation“) des DNA-Fragmentes, indem die eingesetzten dNTPs durch die Polymerase komplementär zur DNA-Matrize an die freie OH-Gruppe des jeweils letzten 3'-Nukleotids nach dem Primer gebunden werden. Die Anzahl der neusynthetisierten DNA-Fragmente steigt exponentiell mit jedem weiteren Zyklus an. Die PCR wurde nach Vorschrift der „Current Protocols in Molecular Biology“ (Kapitel 15.1.2) in einem Thermocycler „OmniGene“ (MWG Biotech) durchgeführt.

### 3.8.1 Standard-PCR

Als Polymerase diente die thermostabile *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Fa. Eppendorf), welche A-Überhänge an den PCR-Produkten anfügt. Da sie keine 3'-5'-Korrekturlesefunktion hat, wurde meist, insbesondere bei größeren Fragmenten, ein Polymerase-Gemisch aus *Taq*-Polymerase und der *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* eingesetzt („Expand™ High Fidelity PCR System“, Firma Roche). Letztere besitzt eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion, bildet aber „blunt ends“. Die PCR-Produkte besitzen daher zum Teil A-Überhänge, so dass sie direkt zur TOPO-Klonierung eingesetzt werden können. Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze betrug 50 µl. Die PCR-Ansätze zur Amplifikation der unterschiedlichen K28-Toxinderivate wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Template DNA (50 ng)	1 µl
Primer 3' (100 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 5' (100 pmol/µl)	0,5 µl
10x Puffer (mit 1,5-2,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
dNTPs (25 µmol)	0,4 µl
Hifi-Polymerase	0,7 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Sofern nicht anders vermerkt wurde folgendes Standard-PCR-Programm verwendet:

95 °C	30 s	} 25-30 Zyklen
95 °C	30 s	
54-57 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	

Je nach Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente sowie der Primerwahl wurden insbesondere die „Annealing“-Temperatur, die Anzahl der Zyklen sowie die Elongationszeit variiert. Die Prozessivität der *Taq*- sowie der Hifi-Polymerase beträgt circa 1000 bp pro Minute. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte in einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

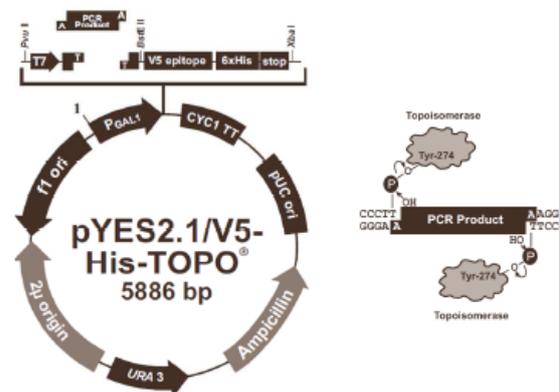
### 3.8.2 SOE-PCR

Die Methode der SOE-PCR („**S**plicing by **O**verlapping **E**xtension“) erlaubt die direkte Herstellung von Fusionsproteinen auf DNA-Ebene, ohne dass Schnittstellen am 3´- bzw. 5´-Ende des jeweiligen Gens angefügt werden müssen. Dabei werden zwei verschiedene DNA-Fragmente unter Einsatz vier verschiedener Primer zu einem rekombinanten Produkt verbunden. Hierzu müssen mehrere PCR-Reaktionen durchgeführt werden. Im ersten Schritt werden die beiden Gene in zwei getrennten Ansätzen mit Hilfe geeigneter Primer so amplifiziert, dass sie an ihrem 3´- bzw. 5´-Ende eine zirka 30 bp überlappende, komplementäre Sequenz besitzen. In einer zweiten PCR dienen diese Ausgangsprodukte als „Template“ und lagern sich über die entstandenen „sticky-end“-Sequenzen aus der ersten PCR zusammen, so dass das Fusionsgen durch die eingesetzten Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifiziert werden kann (Horton *et al.*, 1989). Die Produkte der ersten beiden PCR-Reaktionen, welche nach dem

Standard-PCR-Protokoll durchgeführt wurden, wurden gelelektrophoretisch analysiert und jeweils 5 µl korrekter aus dem Gel isolierter Amplifikate als „Template“ für die eigentliche SOE-PCR eingesetzt. Die „Annealing“-Temperatur wurde von 57°C auf 54°C gesenkt und die Zyklen-Anzahl auf 35 erhöht.

### 3.9 TOPO-Klonierung

Die TA-Klonierung erleichtert sowohl die Sequenzierung als auch die Ligation in Expressionsvektoren. Daher wurde diese Methode als Alternative zur „blunt end“ Ligation eingesetzt. Vor der eigentlichen Klonierung erzeugt die terminale Transferase-Aktivität der *Taq* Polymerase an den 3'-Enden der synthetisierten cDNA unspezifisch A-Überhänge. Unter Anwesenheit der Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus, welche kovalent an den Vektor gebunden ist, lässt sich die cDNA effektiv in den Vektor pCR®II-TOPO® (Invitrogen) ligieren. Dieser linearisierte Vektor trägt einen einzelnen 3'-Thymidin-Überhang (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen verwendeter „Shuttle“-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO® der Firma Invitrogen diente in dieser Arbeit als Hefe-Expressionsvektor. Neben den Replikationsursprüngen für Bakterien (pUC ori, f1 ori) besitzt es einen 2µ „origin“, ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien sowie einen *URA3*-Marker zur Selektion plasmidhaltiger Hefezellen. Zur heterologen Expression wird die Insertionsstelle von dem Galaktose-induzierbaren Promotor  $P_{GAL1}$  sowie dem Terminator *CYC1TT* flankiert.

Zur Synthese der A-Überhänge wurde die cDNA in 10 µl *Taq*-Puffer gelöst und nach Zugabe von 0,5 µl *Taq*-Polymerase sowie 0,3 µl dNTP-Mix 10 min bei 72°C inkubiert. Jeweils 5 µl der behandelten cDNA wurden anschließend zur TA-Klonierung eingesetzt. Die Klonierung erfolgte unter Verwendung des „TOPO TA Cloning-Kit“ der Firma Invitrogen gemäß der Anleitung des Kits. Positive Klone wurden über Blau-Weiß-Screening identifiziert. Nach Restriktionsanalyse wurden Klone mit positivem Ergebnis einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen.

### 3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung aller in dieser Arbeit hergestellten K28-Derivate wurde durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit Hilfe der Sequenziersoftware „SeqMan“ und des Programmes „DNA-Star“ (Lasergene).

### 3.11 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde das Riboprobe<sup>®</sup> System-T7 der Firma Promega verwendet. Da die *in vitro* Synthese von RNA aus DNA das Vorhandensein einer RNA-Polymerase-Bindestelle erfordert, wurde die zu transkribierende DNA zunächst über die Schnittstellen *EcoRI* und *BglII* in den Vektor pGEM1 einkloniert, welcher links der Klonierungsstelle eine T7-Bindungsstelle für die RNA Polymerase des *E. coli*-Phagen T7 besitzt. Dieses Enzym arbeitet sehr effizient und weist eine stringente Promotor-Spezifität auf (Butler *et al.*, 1982). Um auszuschließen, dass die RNA Vektorsequenzen enthält, sollte ein Enzym verwendet werden, das keine 3'-Überhänge erzeugt (Schenborn und Mierendorf, 1985). Hier wurden die Klone vor der Transkription am 3'-Ende der späteren RNA mittels *Bsp1407I*-Restriktion linearisiert. Hierbei ist es besonders wichtig, dass die Plasmid-DNA vollständig linearisiert ist, um eine effiziente Termination der Transkription zu

garantieren und eine einheitliche Population zu erhalten. 10 µg Plasmid-DNA wurden dazu in einem 50 µl Restriktionsansatz 4,5 h bei 37°C verdaut. Um eine hohe Ausbeute zu erreichen, muss die als Template fungierende Plasmid-DNA rein sein. Zu diesem Zweck wurde die linearisierte DNA mit Phenol-Chlorform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 1:1) extrahiert, wobei der Extraktionsschritt mit dem wässrigen Überstand wiederholt wurde, und die DNA anschließend 30 min mit Isopropanol (1:1) gefällt. Nach zwei Waschschritten mit 70% Ethanol wurde das erhaltene Pellet im Dessicator getrocknet und die DNA in 5 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst. Der Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription wurde bei Raumtemperatur nach folgendem Schema pipettiert:

Transcription optimized 5x buffer	5,0 µl
DTT 100 mM	2,5 µl
Recombinant RNasin <sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
Ribonukleotide rATP, rCTP, rUTP, rGTP	5,0 µl
Ribo m <sup>7</sup> G Cap Analog, 5 mM	2,5 µl
Linearisierte Template DNA	2,0 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	6,5 µl
T7 Polymerase	1,0 µl

Das Ribonukleotidgemisch wurde so pipettiert, dass jeweils 5 µl rATP, rCTP und rUTP mit 5 µl rGTP einer 1:10-Verdünnung (1 µl rGTP + 9 µl Nuklease-freies Wasser) gemischt wurden (Endkonzentration: je 0,5 mM). Die Transkription erfolgte eine Stunde bei 37°C im Heizblock. Nach Zugabe von 1 µl T7 Polymerase und 2 µl rGTP (1:10 verdünnt) wurde der Ansatz eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die transkribierte RNA wurde sofort auf Trockeneis gefroren und entweder direkt zur *in vitro*-Translation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Translation einiger Transkripte ist direkt abhängig von der Anwesenheit eines m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G „Caps“ am 5'-Ende. Ein solches „Cap“ ist

beispielsweise wichtig für die Synthese biologisch aktiver Proteine in *Xenopus* Oozyten (Contreras *et al.*, 1982). Methylierte „gecappte“ RNA-Transkripte werden zudem *in vitro* effizienter gespleißt als „ungecappte“ oder unmethylierte „gecappte“ RNA (Konarska *et al.*, 1984). Da also *in vitro* synthetisierte „gecappte“ RNA-Moleküle effiziente Templates für die Translation sind, wurde dem Reaktionsgemisch ein Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analog zugegeben, das so während der Transkriptionsreaktion direkt in die RNA inkorporiert wurde.

## 4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.1 Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 4.1.1 Bradford-Test

Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die von Bradford (1976) entwickelte Methode hat den Vorteil, dass sie schnell und ohne großen Aufwand durchzuführen ist. Zudem ist die Variabilität der Färbung zwischen verschiedenen Proteinen minimal (Read and Northcote, 1981). Da die Reaktion in saurem Milieu abläuft, fallen viele Proteine aus. Weiter können Seifen wie Triton-X-100, SDS oder Chaps stören.

5 µl entsprechend verdünnter Proteinproben sowie verschiedene Konzentrationen an BSA als Eichsubstanz wurden in mindestens drei Parallelansätzen in Wells einer 96er Mikrotiterplatte mit 200 µl Bradfordlösung (1:5 verdünnt mit H<sub>2</sub>O millipore) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Anhand der BSA-Eichgerade wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

### 4.1.2 BCA-Test

Protein bildet mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung in der sogenannten Biuret-Reaktion einen Komplex. Die im Komplex vorliegenden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, welche schließlich mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die von Smith *et al.* (1985) beschriebene Methode zur Proteinquantifizierung ist schnell, empfindlich und resistent gegen Seifen wie Triton-X-100. Zudem bleiben fast alle Proteine in Lösung. Marshall und Williams (1991) fanden jedoch heraus, dass hohe Konzentrationen komplexbildender Substanzen wie EDTA und viele weitere Substanzen die Reaktion stören. In dieser Arbeit wurde das BCA-Protein Assay Kit der Firma Sigma verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei BSA als Eichsubstanz Verwendung fand.

### 4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### SDS-Probenpuffer (2x)

SDS	8 %
Tris-HCl, pH 6,8	120 mM
Glycerin (96 %)	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 %

Von Tris-HCl wurde eine 0,5 M Stammlösung hergestellt, die dann entsprechend dem Endvolumen des Probenpuffers verdünnt wurde. Unter reduzierenden Bedingungen wurden dem Probenpuffer noch 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch zugefügt.

#### Sammel-/Trenngelpuffer für Tris/Tricin-Gele

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

Anodenpuffer (5x)

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

Kathodenpuffer (5x)

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

Die oben genannten Puffer wurden bei 4°C gelagert.

Proteine besitzen als amphotere Makromoleküle einen unterschiedlichen Anteil an positiv und negativ geladenen sowie ionisierbaren Aminosäureresten. Die elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamid-Gel ist daher nicht nur von der Größe und Form, sondern insbesondere von der Nettoladung des Moleküls unter den gegebenen Bedingungen abhängig. Die von Shapiro *et al.* (1967) eingeführte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bietet den Vorteil, Proteine in Gegenwart eines SDS Überschusses und Denaturierungsreagenzien allein entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufzutrennen. Die anionische Seife SDS lagert sich unter Bildung von negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis an Proteine an; gleichzeitig unterbindet es die Ausbildung von Quartärstrukturen, so dass es zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine kommt. Während der elektrophoretischen Auftrennung wandert der SDS-Protein-Komplex zum Plus-Pol, wobei der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius auftrennt. Das Gelnetzwerk entsteht hierbei durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des Quervernetzers N',N-Methylen-bisacrylamid. In der vorliegenden Arbeit wurden 10-12%-ige Tris/Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem verwendet (Schägger und Jagow, 1987).

Zusammensetzung der Tris/Tricin-Gele (10%)

Trenngel 2x

Rotiphorese Gel 30	5,88 ml
Tris HCl pH 8,45	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	2,12 ml
Glyzerin	2 ml
APS	80 µl
TEMED	25 µl

Zum Glätten der Oberfläche wurde Isopropanol auf das Trenngel pipettiert. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde die Oberfläche mit Wasser gespült und anschließend mit Sammelgel überschichtet.

Sammelgel:

Rotiphorese Gel 30	1,62 ml
Tris HCl pH 8,45	3,1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	7,78 ml
APS	80 µl
TEMED	25 µl

Aliquots der Proteinproben wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und nach Abkühlung auf die Tris/Tricin-Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 80 V über 10 min, um die Proteine der Probe im Sammelgel zu konzentrieren. Die weitere Auftrennung der Proteine erfolgte circa eine Stunde bei 110 V im vertikalen Elektrophoresesystem „Mini-Protean II“ (BioRad). Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und in Western-Blot-Analysen immunologisch detektiert oder alternativ mittels Coomassie oder Silbernitrat sichtbar gemacht. Zur späteren Größenbestimmung wurde der Proteinlängenstandard PageRuler Prestained (Fermentas) mitgeführt.

### 4.3 Western Blot

Ziel dieser Methode (Burnette, 1981) ist der immunologische Nachweis von Proteinen. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden hierzu möglichst vollständig auf eine synthetische Membran übertragen, so dass ein genaues Abbild des Bandenmusters entsteht. Die an die Membran gebundenen Proteine sind somit für spezifische Antikörper leicht zugänglich und können detektiert werden.

#### 4.3.1 „Semi-Dry“-Blotting

##### Transferpuffer

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

Der Transferpuffer wurde bei 4°C gelagert.

##### Blockingpuffer

Der Blockingpuffer wurde vor Gebrauch jeweils frisch angesetzt. Hierzu wurden 2,5 % Casein oder alternativ 5 % Magermilch in Waschpuffer mit 0,05 % Tween 20 gelöst.

##### Waschpuffer

0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x TBS

##### TBS-Puffer (10x)

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

Zur Einstellung des pH-Wertes müssen 60 ml HCl<sub>konz.</sub> hinzugegeben werden.

### Färbelösung

Tris-HCl pH 9,5	100 mM (3x)
MgCl <sub>2</sub>	50 mM (3x)
NaCl	100 mM (3x)

Die jeweiligen Lösungen wurden 3x-fach konzentriert angesetzt und kurz vor Gebrauch 1:1:1 gemischt.

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde kurz in 100%-igem Methanol getränkt und mit 3 mm „Whatman-Blotting“-Papieren gleicher Größe fünf Minuten in kaltem Transferpuffer gewaschen. Das „Gelsandwich“ wurde wie im Folgenden beschrieben zusammengebaut. Auf die Anodenplatte der „TransBlot SD Electrophic Transfer Cell“ der Firma BioRad wurde ein „Blotting“-Filter platziert, darüber wurden die PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei gelegt. Den Abschluss des „Gelsandwiches“ bildete ein weiterer „Blotting“-Filter. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 1,5 Stunden bei 50 mA/Gel.

### **4.3.2 Immunodetektion**

Die in dieser Arbeit zur Immunodetektion verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie die eingesetzten Pufferbedingungen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Hersteller und nähere Informationen sind der Tabelle 11 unter Punkt 6.1 zu entnehmen. Als sekundäre Antikörper dienten sowohl alkalische Phosphatase- als auch Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper.

**Tabelle 6: Zur Immunodetektion eingesetzte primäre Antikörper und die jeweiligen Inkubationsbedingungen**

primärer Antikörper	sekundärer Antikörper	Verdünnung	Blockingpuffer
anti-K28 $\alpha$	Rabbit	1:100	5% Magermilch in 1x TBS + 0,05% Tween
anti-K28 $\beta$	Rabbit	1:500	5% Magermilch in 1x TBS + 0,05% Tween
anti-K28	Rabbit	1:5.000	5% Magermilch in 1x TBS + 0,05% Tween
anti-V5	Mouse	1:1000	5% Magermilch in 1x TBS + 0,05% Tween
anti-Ubiquitin	Mouse	1:400	5% Magermilch in 1x PBS + 0,05% Tween

#### 4.3.2.1 Colorimetrischer Nachweis

Die PVDF-Membran mit immobilisierten Proteinen wurde  $\ddot{u}$ N in 25 ml Blocking-Puffer geblockt, um unspezifische Hybridisierungen zu verhindern. Danach wurde die Membran f $\ddot{u}$ r eine Stunde in der prim $\ddot{a}$ ren Antik $\ddot{o}$ rperl $\ddot{o}$ sung (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) in 20 ml Blockingpuffer auf einem Taumelschüttler inkubiert, zweimal mit Waschpuffer gesp $\ddot{u}$ lt und eine weitere Stunde mit einem alkalische Phosphatase (AP) -gekoppelten sekund $\ddot{a}$ ren Antik $\ddot{o}$ rper (1:500 in entsprechendem Blockingpuffer) behandelt. Nach Sp $\ddot{u}$ len der Membran mit Waschpuffer (1xTBS + 0,05% Tween) wurde sie viermal 5 min in Waschpuffer gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Umsetzung des chromogenen Substrates NBT/BCIP (1:500 in 10 ml F $\ddot{a}$ rbepuffer) durch die alkalische Phosphatase.

#### **4.3.2.2 Detektion mittels Chemilumineszenz**

Der Einsatz sekundärer Antikörper mit Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat erlaubt durch Umsetzung eines entsprechenden Substrates in ein lumineszierendes Produkt einen wesentlich sensitiveren Nachweis im Vergleich zu AP-gekoppelten Antikörpern. HRP-gekoppelte anti-Mouse-Antikörper wurden 1:50.000 in Blockingpuffer verdünnt eingesetzt; anti-„Rabbit“ Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000. In dieser Arbeit kam das SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Kit der Firma Thermo Scientific zum Einsatz. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Visualisiert wurden entsprechend behandelte Blots mittels „ChemiDoc-XRS-System“ und der Analyse Software „Quantity One 4.6.2“ (Fa. Biorad). Alternativ erfolgte bei schwachen Signalen eine Entwicklung mittels Röntgenfilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche).

#### **4.3.2.3 „Stripping“ und „Reprobing“**

Um eine Western-Blot-Membran einer weiteren Detektion mit einem anderen Antikörper zu unterziehen, müssen Antikörper und Nachweisreagenzien, welche an die auf der Membran immobilisierten Proteine gebunden sind, zunächst entfernt werden; ein Vorgang, der als „Stripping“ bezeichnet wird. Hierzu wurde der Blot mit 20 ml „Stripping“-Reagenz Restore<sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer der Firma Thermo Scientific überschichtet und 12 min bei 20°C inkubiert. Durch erneute Zugabe des Substrates wurde das vollständige Entfernen des sekundären Antikörpers überprüft. Vor dem „Reprobing“ mit einem anderen Antikörper wurde der Blot einmal 10 min mit Waschpuffer gewaschen und die Membran anschließend eine Stunde mit Blockingpuffer geblockt.

#### 4.4 *In vitro* Translation [<sup>35</sup>S] markierter Proteine

*In vitro* synthetisierte „gecappte“ RNA-Moleküle sind effektive Templates für die Proteintranslation. Krieg und Melton konnten zeigen, dass SP6-abgeleitete *in vitro*-Transkripte in injizierten Oozyten so effizient translatiert werden wie native mRNA (Krieg und Melton, 1984). Zellfreie Extrakte von Weizenkeimen und Kaninchen Retikulozytenlysat unterstützen die *in vitro* Translation einer Vielzahl viraler, prokaryotischer und eukaryotischer mRNA (Anderson *et al.*, 1983). Als Translationssystem diente hier Weizenkeimextrakt (Wheat germ extract system, Promega). Dieser Weizenkeimextrakt ist mit einer Mikrokokken-Nuklease vorbehandelt, so dass endogene RNA entfernt und Hintergrund-Translation minimiert wird. Der Extrakt enthält alle zur Proteinsynthese benötigten zellulären Komponenten: tRNA, Ribosomen sowie Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren. Lediglich die Zugabe von Aminosäuren und mRNA sind notwendig zur Stimulation der Translation. Zur Optimierung der Reaktion kann weiterhin Kaliumacetat zugesetzt werden.

Die *in vitro* Translation wurde nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Wheat Germ Extract	25 µl
Aminosäuremix, ohne Methionin	4,0 µl
Kaliumacetat	3,5 µl
RNasin®	1,0 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	12 µl
RNA	2,0 µl
[ <sup>35</sup> S] Methionin	5,5 µl = 60 µCi

Die Translationsreaktion erfolgte im Heizblock bei 30°C eine Stunde.

#### 4.5 „Pulse“-Experiment

##### Lyse-Puffer

Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
SDS	1%

##### Tris/Azid

Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
NaAzid	20 mM frisch angesetzt

##### Tris/DTT/Azid

Tris/HCl, pH 9,4	100 mM
DTT	20 mM
NaAzid	20 mM frisch angesetzt

Ausgehend von einer frischen  $\bar{u}N$ -Kultur in 20 ml ura-Raff Medium, die mit 5 ml einer frischen Vorkultur beimpft wurden, wurden  $1,5 \times 10^8$  Zellen geerntet und in 1 ml vorgewärmten (30°C) ura-Gal Medium resuspendiert, zweimal in vorgewärmten ura-Gal Medium gewaschen und anschließend in 1 ml vorgewärmten (30°C) ura-Gal Medium resuspendiert. Von der Probe „0“ wurden 500  $\mu$ l abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die restliche Probe wurde zu 9 ml ura-Gal Medium gegeben und bei 30°C im Schüttler vier Stunden inkubiert. Die Probe „0“ wurde zunächst zweimal in ura/met-Gal Medium gewaschen, nach dem letzten Waschschrift in 250  $\mu$ l ura/met-Gal-Medium aufgenommen und 30 Minuten bei 30°C im Heizblock inkubiert. Zum „Labeln“ neusynthetisierter Proteine wurden dem Ansatz 5,5  $\mu$ l [ $^{35}S$ ] Promix (entspricht 60  $\mu$ Ci) zugegeben, durch Rühren gemischt und 1 h bei 30°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Probe auf Eis gestellt und mit 750  $\mu$ l eiskaltem Tris/Azid versetzt. Die Probe wurde solange auf Eis belassen, bis alle weiteren Proben (4 h) entsprechend behandelt wurden, mindestens aber 5 min. Die Ansätze wurden 1 min bei 13.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 750  $\mu$ l Tris/Azid/DTT resuspendiert. Nach

zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut geerntet und mit 200 µl Glasperlen in Lysepuffer versetzt. Zur Zellyse wurden die Ansätze zunächst 2 min auf Trockeneis schockgefroren, nach schnellem Auftauen im Wasserbad 2 min gevortext und anschließend 3 min bei 95°C aufgeköcht, bevor sie erneut 2 min gevortext wurden. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Dem Zellysat wurden 800 µl IP-Puffer (mit Protease-Inhibitoren) zugefügt, invertiert und der Ansatz kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, in welchem 50 µl Pansorbin vorgelegt waren und es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 min. Der Ansatz wurde wiederum abzentrifugiert und der erhaltene Überstand zur Immunpräzipitation eingesetzt.

#### 4.6 Immunpräzipitation

##### Protein A Sepharose CL-4B

Die Protein A Sepharose wurde in NET-Puffer (4°C) mindestens 4 h gequollen, anschließend bei 4°C abzentrifugiert und in 10 ml 1M Tris pH 7,5 resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurde die Sepharose in 15 ml NET-Puffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

##### NET-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	0,1 % v/v

##### IP-Puffer

NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
SDS	0,1%
Tris/HCl, pH 7,5	15 mM
NaAzid	2 mM

Urea-Puffer

Harnstoff	2 M
NaCl	200 mM
Triton X-100	1%
Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
NaAzid	2 mM

ConA-Puffer

NaCl	500 mM
Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
Triton X-100	1%
NaAzid	2 mM

Tris-NaCl-Puffer

NaCl	50 mM
Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
NaAzid	2 mM

SDS-Probenpuffer (Laemmli)

Tris, pH 6,8	62,5 mM
SDS	2 %
Glycerin	10 %
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 %
Bromphenolblau	0,001 %

Die Methode der Immunpräzipitation erlaubt den Nachweis bestimmter Antigene in Zelllysaten. Mittels Gelelektrophorese können anhand von Größenunterschieden im Gel auch posttranslationale Modifikationen wie Veränderungen im Glykosylierungsmuster oder Ubiquitinierung nachgewiesen werden. Weiter können Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen untersucht werden. Protein A-Sepharose eignet sich hervorragend zur Immunpräzipitation, da hier die Antikörper an eine feste Phase gekoppelt sind und die Immunkomplexe durch einfaches

Abzentrifugieren gewonnen werden können. Protein A, ein Zellwandprotein aus *Staphylokokkus aureus*, bindet, ebenso wie Protein G, IgG-Moleküle gerichtet über ihren Fc-Teil, mit dem Vorteil, dass alle Antigenbindestellen frei zugänglich sind. Dadurch sind Sensitivität und Ausbeute deutlich erhöht gegenüber Matrices wie beispielsweise voraktivierte Sepharose, die keine oder nur teilweise gerichtete Kopplung der Antikörpermoleküle erlaubt.

Zu 100 µl 10% Protein A Sepharose wurden 5 µl anti-K28-Antikörper pipettiert. Nach Zugabe des Zelllysates erfolgte die Immunpräzipitation in 100 µl bei 4°C auf dem Drehrad. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 1 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet verschiedenen Waschschritten unterzogen. Zunächst wurden die Ansätze jeweils zweimal mit IP- und Urea-Puffer gewaschen, anschließend je einmal mit ConA- und Tris/HCl-Puffer. Nach dem letzten Waschschriff wurde vorsichtig der gesamte Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet mit 35 µl 2x SDS-Probepuffer (reduzierend) versetzt. Durch fünfminütiges Erhitzen der Proben auf 95°C wurden die Proteine denaturiert und von der Antikörper-gekoppelten Sepharose gelöst und konnten nun in einer SDS-PAGE analysiert werden. Als Größenstandard diente bei gelabelten Proben ein [<sup>14</sup>C]-markierter „Protein molecular weight marker CFA75G“ (GE Healthcare). Die Proben wurden in 10%-igen Tris/Tricin-Gelen aufgetrennt und die PVDF-Membranen nach dem Blotting der Gele für 3 Tage bei -80°C auf einem Lumi-Film (Fa. Eppendorf) belassen, um eine ausreichende Signalstärke zu gewährleisten.

#### 4.7 Zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese

##### 2x DiGE-Lyse-Puffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Chaps	4 %
Pharmalyte	2 % v/v
DTT	2 %

##### DiGE-Labeling-Puffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Chaps	4 %
Tris	30 mM

Die gekühlte Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,5 titriert.

##### Rehydrations-Puffer

Harnstoff	7 M
Serdolit	0,5 % (w/v)
Thio-Harnstoff	2 M
Isopropanol	10 % (v/v)
Glyzerin (87%)	5 % (v/v)

Der Harnstoff wurde in einem möglichst kleinem Volumen H<sub>2</sub>O millipore gelöst (30°C-Wasserbad) und die Lösung nach Zugabe von Serdolit 10 min gerührt. Diese Lösung wurde anschließend über einen Filter zu 2 M Harnstoff gegeben. Nach dem Lösen des Thio-Harnstoffes erfolgte die Zugabe von Isopropanol und Glyzerin sowie ein wenig Bromphenolblau. Der Puffer wurde in 1,5 ml Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 2,5 % DTT sowie 2 % IPG3-11-Puffer frisch zugegeben.

Äquilibrierungs-Puffer

Harnstoff	6 M
SDS	2 %
Tris, pH 8,8	50 mM
Glycerin	30 %

10x SDS-Elektrophorese-Puffer

PlusOne Tris	60,5 g
PlusOne Glycin	288 g
PlusOne SDS	20 g
H <sub>2</sub> O millipore	ad 2 L

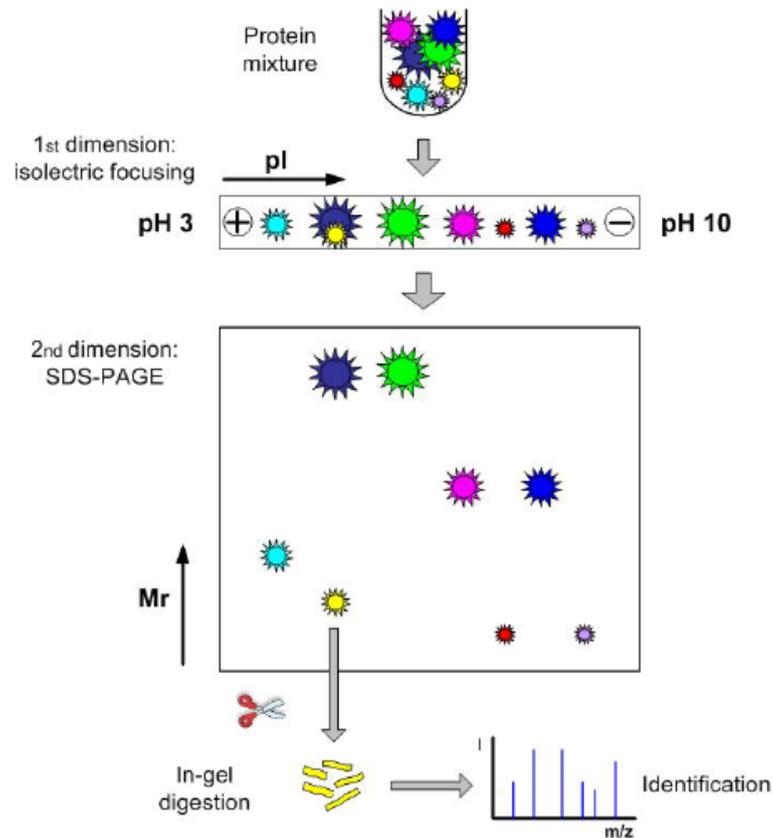
Zusammensetzung der Acrylamidgele (12,5 %):

Menge für 6 Gele:

Acrylamid-Stammlösung	30,8 % (v/v)
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	113 ml
H <sub>2</sub> O millipore	144 ml
SDS	450 mg
APS	450 mg
TEMED	63 µl

Diese Methode zur Analyse komplexer Proteingemische wurde 1975 unabhängig von O'Farrell und Klose entwickelt. Jedoch erst mit der Einführung immobilisierter pH-Gradienten wurde die Methode reproduzierbar und erlaubte eine hochauflösende Trennung von Proteinen (Corbett *et al.* 1994, O'Farrell, 1975; Klose, 1975). In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), wandern die Proteine in einem Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) bei Spannungen von 50 bis 8.000 V zu ihrem isoelektrischen Punkt (pI) – dem pH-Wert, an dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist. In der darauffolgenden zweiten Dimension werden die nach ihrem pI getrennten Proteine einer SDS-PAGE unterzogen, wobei der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem

Molekulargewicht auftrennt. Die experimentelle Vorgehensweise orientierte sich weitgehend an dem Review von Görg *et al.* (2000). Einen schematischen Überblick über die zweidimensionale Gelelektrophorese liefert die Abbildung 5.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der 2D-PAGE (aus Lasaosa, 2008).** In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. In der zweiten Dimension werden die Proteine in einer SDS-Lösung denaturiert und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Interessante Proteine werden schließlich tryptisch verdaut und mittels MS identifiziert.

#### 4.7.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Proteinkonzentration der Proben wurde auf 10 mg/ml in DIGE-Labelling-Puffer eingestellt. Pro Gel wurden 500 µg Protein eingesetzt. Nach der Methode von Sanchez *et al.* (1997) wurden die IPG-Streifen (Immobiline™ Dry Strip pH 4-7, 18 cm; GE Healthcare) direkt in der Proteinlösung aufgequollen. Die Rehydratation erfolgte 16 h in Rehydrationspuffer (mit 2,5 % DTT und 2 % IPG-Puffer). Um ein Austrocknen des IPG sowie das Auskristallisieren von Harnstoff zu

verhindern, wurden die Gelstreifen mit 1,8 ml Mineralöl überschichtet. Die rehydrierten Streifen wurden in die IEF-Kammer übertragen, anodische und kathodische Enden mit je einem mit deionisiertem Wasser befeuchteten Filterpapierplättchen bedeckt und erneut mit Mineralöl überschichtet, damit während des Fokussierens kein Wasser verdunstet. Die Fokussierung erfolgte mittels Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences), wobei das in Tabelle 7 dargestellte, optimierte Programm zum Einsatz kam.

**Tabelle 7: IPGphor-Protokoll** zur isoelektrischen Fokussierung von 500 µg Gesamt-Zellprotein des toxinbehandelten *S. cerevisiae*-Stammes TM230

Step-Nr		Volt	Voltstunden VHrs, Hrs	Anzahl Hrs
1	Gradient	500	VHrs	2500
2	Step	500	VHrs	1000
3	Gradient	3500	VHrs	10000
4	Step	3500	VHrs	3500
5	Gradient	8000	VHrs	10000
6	Step	8000	VHrs	32000
7	Step	500	Hrs	99
8	Gradient	0	Hrs	0
9	Gradient	0	Hrs	0

Nach der Fokussierung müssen die Proteine im IEF-Gel mit SDS gesättigt werden. Dazu wurde jeder Streifen mit 5 ml Äquilibriumspuffer mit 1 % DTT 15 min inkubiert. Die Blockierung freier SH-Gruppen wurde durch Inkubation mit Äquilibriumspuffer erreicht, welchem 2,5 % Iodacetamid zugesetzt wurde.

#### 4.7.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Der mit SDS äquilibrierte IEF-Streifen wurde luftblasenfrei auf die Geloberfläche aufgebracht und mittels heißer Agaroselösung (0,5 % Agarose in 1x Laufpuffer mit 0,03 % Bromphenolblau) auf dem 12,5 %-igen Acrylamidgel fixiert. Die Elektrophorese erfolgte im „Ettan DaltSix Electrophoresis System“ (Amersham Biosciences) zunächst eine Stunde bei 2 W/Gel und anschließend 6 h bei 17 W/Gel.

#### 4.8 DIGE

„Differential in Gel Electrophoresis“ (DIGE) wurde erstmals 1997 von Unlü *et al.* (1997) beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte 2D Gelelektrophorese, welche die Detektion und statistisch abgesicherte Quantifizierung geringer Unterschiede zwischen Proteinproben erlaubt, die im selben 2D Gel aufgetrennt wurden. Diese Technologie beruht auf der kovalenten Modifikation von Proteinextrakten mit fluoreszierenden „cyanidine (Cy) dyes“, die unterschiedliche Extinktions- und Emissionsspektren besitzen. Die eingesetzten „Cy dyes“ sind pH-unempfindlich und daher bezüglich ihrer Ladung und Größe so angepasst, dass sie das Wanderungsverhalten eines Proteins kaum beeinflussen. Folglich wandert dasselbe Protein, welches jeweils mit einem der Farbstoffe (Cy2, Cy3, Cy5) gelabelt ist immer zur selben Position innerhalb eines 2D Gels. Durch die parallele Auftrennung der zu vergleichenden Proben in einem Gel werden Laufdifferenzen eliminiert, wodurch die Reproduzierbarkeit erheblich verbessert wird (Wu, 2006). Die Nutzung eines internen Standards, bestehend aus einem Pool aller Proben des Experimentes, kann zudem Variationen in der Spot-Menge kompensieren. Um die statistische Aussagekraft des Experimentes zu gewährleisten, wurden jeweils vier Gele in der in Tabelle 8 angegebenen Weise parallel durchgeführt. Die eingesetzten „CyDye DIGE“-Farbstoffe besitzen eine reaktive NHS-Ester-Gruppe, wodurch das Fluorochrom kovalent über eine Amidbindung an die

$\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinreste der Proteine gekoppelt wird. Zum „Labelling“ wurden jeweils 50  $\mu\text{g}$  der entsprechenden Proben sowie des internen Standards mit 1  $\mu\text{l}$  der entsprechenden, nach Herstellerangaben verdünnten, CyDye-Lösung versetzt, gevortext und kurz abzentrifugiert. Die kovalente Bindung der Farbstoffe an die Proteine der Proben erfolgte über 30 min auf Eis im Dunkeln. Durch das sogenannte „Quenching“ wurde überschüssiger Farbstoff durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Lysin zu jeder Probe abgefangen; diese Reaktion erfolgte über 10 min im Dunkeln auf Eis. Je 50  $\mu\text{g}$  der so behandelten Probe, Kontrolle und des internen Standards wurden mit 350  $\mu\text{g}$  ungelabeltem Standard vermengt und nach Zugabe eines Volumens 2x Lysispuffer (ergänzt um 2 % DTT und 2 % Pharmalyte) sowie 220  $\mu\text{l}$  Rehydrationslösung (mit je 1 % DTT und Pharmalyte) zur 2D Gelelektrophorese eingesetzt. Die Durchführung der ersten und zweiten Dimension erfolgte wie unter Punkt 4.7.1 und 4.7.2 beschrieben.

**Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Durchführung eines statistisch abgesicherten DIGE Experimentes mit zwei Proben**

Gel Nr.	Probe	Kontrolle	interner Standard
1	P1 – Cy3	K1 – Cy5	S1 – Cy2
2	P2 – Cy3	K2 – Cy5	S2 – Cy2
3	P3 – Cy5	K3 – Cy3	S3 – Cy2
4	P4 – Cy5	K4 – Cy3	S4 – Cy2

Zur Auswertung wurden die DIGE-Gele mit Hilfe des Scanners Typhoon<sup>TM</sup> 9410 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) gescannt und die Proteinspots der einzelnen Proben mittels „DeCyder<sup>TM</sup> image analysis“ Software analysiert. Zunächst wurden mittels „Differential in-gel analysis“ (DIA) alle Protein-Spots von Probe und Kontrolle innerhalb eines Gels sowie die ihnen zugehörigen Fluoreszenz-Intensitäten verglichen. Anschließend wurde eine „Biological variation analysis“ (BVA) durchgeführt, in der durch

sogenanntes „Matching“ der Proteine alle Spots eines Gels mit allen „Spots“ der insgesamt 12 Gele (Cy2, Cy3 und Cy5-Proben in jeweils vier parallelen Ansätzen) abgeglichen wurden. Die mittels BVA erhaltenen Daten sind statisch abgesicherte Ergebnisse. Ausgehend von dieser Auswertung wurde nun ein sogenannter Proteinfiler angewendet, der innerhalb aller 12 Gele diejenigen Proteinspots angibt, die bei einem T-Test-Wert von  $<0,05$  eine Durchschnitts-Ratio von kleiner 1,5 oder größer 1,5 besitzen, die also im Vergleich zur Kontrolle mindestens um das 1,5-fache hoch- oder herunterreguliert vorlagen.

#### 4.9 Coomassie-Färbung

##### Fixierer

Ethanol	50 %
Phosphorsäure	3 %
H <sub>2</sub> O millipore	47 %

##### Prä-Inkubations-Lösung

Ammoniumsulfat	17 %
Phosphorsäure	3 %
H <sub>2</sub> O millipore	46 %
Methanol	34 %

Ammoniumsulfat wurde in Wasser-Säure-Gemisch gelöst und tropfenweise mit Methanol versetzt.

##### Färbelösung

Pro Gel wurden 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 in 17 ml Methanol gelöst.

Zur Coomassie-Färbung wurden die Gele zunächst über Nacht mit Fixierer behandelt, um die Proteinspots auf dem Gel zu fixieren. Nach drei Waschschrinen á 20 Minuten in H<sub>2</sub>O millipore wurden sie eine Stunde in der Prä-Inkubations-Lösung belassen, bevor die Gele in der Coomassie Brilliant Blue-Lösung vier bis fünf Tage gefärbt wurden.

Zur Entfernung des blauen Hintergrunds erfolgten über zwei bis drei Stunden mehrere Waschschrirte mit H<sub>2</sub>O millipore. Die Gele konnten nun eingescannt und die interessanten Proteinspots zur Identifizierung mittels MALDI mit Hilfe des Ettan Spotpickers (Amersham Biosciences) ausgestanzt werden.

#### 4.10 „In-Gel“ Trypsinverdau

Die mittels Ettan Spotpicker (Fa. Amersham Biosciences) oder per Hand aus dem 2D Gel ausgestanzten Proteinspots wurden einzeln in die Vertiefungen einer 96 well-Platte überführt, zweimal mit H<sub>2</sub>O millipore gewaschen und anschließend mit 50 µl 40 mM Ammoniumbicarbonat 10 Minuten unter Schütteln inkubiert. Das in den ausgestanzten Gelblöckchen noch vorhandene Coomassie Brilliant Blue wurde mit einer Acetonitril-Ammoniumbicarbonat-Mischung (1:1) entfernt. Um die entfärbten Gelstückchen zu trocknen, erfolgte die Zugabe von 50 µl Acetonitril. Die getrockneten Proteinspots wurden nach vollständigem Verdampfen des Acetonitrils in 10 µl Trypsinlösung (0,8 µg in 4 ml 4 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) über einen Zeitraum von mindestens 15 Minuten gequollen. Nach Zugabe weiterer 10 µl Ammoniumbicarbonatlösung erfolgte der Trypsinverdau über Nacht bei 37°C.

#### 4.11 MALDI ToF/ToF Analyse

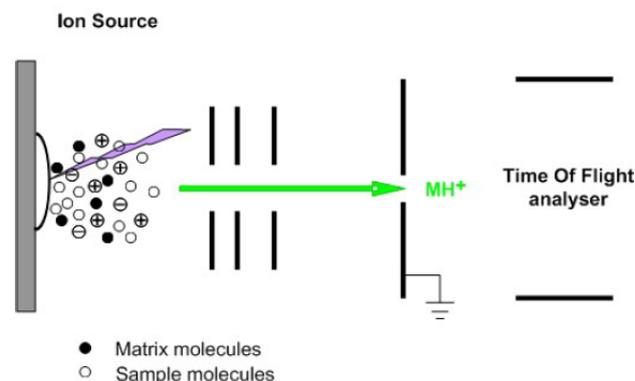
##### Matrixlösung

Acetonitril (ACN)	50 %
H <sub>2</sub> O millipore	49,9 %
TFA	0,1 %

Der Hälfte der Lösung wurden 5 mg/ml α-cyano-4-hydroxizimtsäure (CCA) als Matrix zugesetzt.

Für ihre methodischen Entwicklungen zur Identifikation von biologischen Makromolekülen in den späten 1980er Jahren wurden Michael Karas und Franz Hillenkamp von der Universität Münster 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Heute stellt die Massenspektrometrie in Kombination mit MALDI eine der wichtigsten Analysemethoden für die Peptid- und Proteinanalytik dar und erlaubt eine sehr genaue Bestimmung von Molekülmassen (Karas, M. *et al.* 1987; Tanaka, T. *et al.* 1988). Nach proteolytischer Spaltung der Proteine können direkt Informationen über die Aminosäuresequenz der generierten Peptidprodukte gewonnen und unbekannte Proteine durch Datenbankabgleich identifiziert werden.

Für die MALDI-Massenspektrometrie wird die Proteinprobe zunächst mit einer geeigneten, die verwendete Laserwellenlänge absorbierenden Matrix auf eine Analyseplatte gegeben. Auf der MALDI-Platte verdampft das Lösungsmittel und die Analytprobe ko-kristallisiert mit Matrixkristallen. Die Kristalle werden im Massenspektrometer unter Hochvakuum mit einem Impulslaser bestrahlt, wodurch die in die Matrix eingebauten Proteinionen explosionsartig freigesetzt werden und „nackt“ in die Gasphase übergehen. Im Wesentlichen übertragen die UV-absorbierenden Matrixmoleküle bei der MALDI-Ionisierung Protonen auf die Peptide der Probe und verleihen ihnen somit eine (einfach) positive Ladung. In Abbildung 6 ist die Ionenquelle eines MALDI ToF-Gerätes dargestellt.



**Abbildung 6: Ionenquelle eines MALDI-ToF Gerätes.** Ein Laser bestrahlt mit einer Wellenlänge von typischerweise 355 nm (Nd:YAG) oder 337 nm ( $N_2$  Laser) die Probe. Die Peptide werden durch Protonentransfer von Matrixionen ionisiert. Danach werden sie durch Anlegen einer Hochspannung an den „time-of-flight“ (ToF) Analysator beschleunigt (+20 kV).

Die Massenanalyse der Ionen erfolgte hier mittels „time-of-flight“ (ToF)-Analysator. Nach der Ionisierung werden die Ionen in der Quelle durch das elektrostatische Feld auf eine kinetische Energie von einigen Kiloelektronenvolt in Richtung Analysator beschleunigt. Die kinetische Energie, die die Ionen dabei erhalten, ist durch die elektrische Potenzial-Energie  $E_{el}$  festgelegt:

$$E_K = \frac{1}{2} * (m * v^2) = q * V_s = E_{el} \quad (1)$$

wobei  $m$  = Masse des Analyts darstellt und  $q$  = Gesamtladung des Ions, definiert als

$$q = z * e \quad (2)$$

Nach dem Verlassen der Ionenquelle durchlaufen die Ionen eine feldfreie Driftstrecke im Hochvakuum, in der sie nach ihrem Masse/Ladungs-( $m/z$ ) Verhältnis aufgetrennt werden. Dies gelingt, da Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten bei gleicher kinetischer Energie in der Beschleunigungsstrecke der Quelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht wurden. Da sich leichtere Ionen schneller fortbewegen, erreichen sie den Detektor früher als schwere Ionen. Die Flugzeit ( $t$ ) des Ions im Massenanalysator ist abhängig von der Geschwindigkeit ( $v$ ) und der Wegstrecke des ToF ( $L$ ), welche konstant ist.

$$v = L/t \quad (3)$$

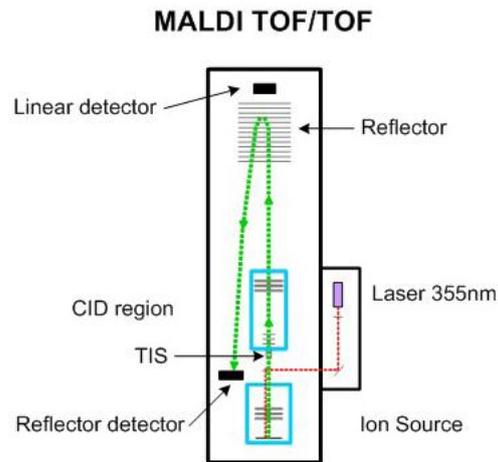
Durch Einsetzen der Gleichungen (2) + (3) in Gleichung (1) ergibt sich:

$$m/z = t^2 * (2 * V_s * e/L^2)$$

Im time-of-flight (ToF) Analysator wird das Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  also durch die Messung der Flugzeit bestimmt, die die Ionen benötigen, um den Detektor zu erreichen. Zur Verbesserung der Massenauflösung werden ToF-Analysatoren mit einem elektrischen Reflektor (=Reflectron) ausgestattet, welcher gegenüber der Ionenquelle sitzt und ein elektrisches Feld erzeugt, das die Ionen

bremst und sie zum ToF zurückschickt. Ionen mit demselben  $m/z$ -Verhältnis, die die Quelle mit unterschiedlicher kinetischer Energie  $E_K$  verlassen, betreten das Reflectron zu unterschiedlichen Zeiten. Ionen mit höherer kinetischer Energie dringen jedoch tiefer in den Reflektor ein und verlassen das Reflectron zusammen mit Ionen desselben  $m/z$ -Verhältnisses, so dass sie den Detektor zur selben Zeit erreichen. Das Reflectron korrigiert somit die kinetische Energieverteilung und sorgt für eine verbesserte Massenauflösung.

Das Spektrum, das man im MS-Modus erlangt, erlaubt Messung von Ionen an einer Stelle und ermöglicht die Auswahl von Vorprodukten für die spätere MS/MS Analyse. Im MS/MS-Modus wird das Vorläuferion vor der Fragmentierung isoliert. Das gewünschte Ion wandert durch ein erstes lineares ToF und wird durch den „Timed Ion Selector“ TIS gefiltert, der aus zwei in Serie geschalteten „Ionengates“ besteht. Die erste Schleuse lenkt Masse-arme Ionen durch die angelegte Spannung um. Wenn ein ausgewählter Vorläufer ankommt, öffnet sich das „Gate“ und lässt das Ion passieren. Die zweite Schleuse schließt hinter dem Ion, um Masse-reiche Ionen umzulenken. Ein Vorläufer, der die CID-Zelle betritt (CID = „collision induced dissociation“) wird auf 1 kV gebremst und die Fragmentierung wird durch energiereiche Kollisionen (1-2 kV) mit Luftmolekülen oder neutralem Gas wie Ar, He oder  $N_2$  induziert. Ionen, die die CID-Region verlassen, werden in der zweiten Quelle zum zweiten ToF-Analysator (= Reflectron ToF) hin beschleunigt und schließlich detektiert. Der Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten MALDI ToF/ToF-„Analyzers“ ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung eines MALDI ToF/ToF Massenspektrometers.** Der Hauptunterschied zu einem Standard MALDI ToF Massenspektrometer ist das Vorhandensein des TIS und des CID-Bereiches.

Die Identifizierung eines Proteins erfolgt durch Abgleich des erhaltenen Spektrums mit Daten einer Datenbank, die das sequenzierte Genom des untersuchten Organismus enthält. Dabei werden die durch die Messung erhaltenen Massen mit den vorhergesagten Massen, welche durch *in silico* Verdau des Proteins erhalten werden, abgeglichen.

Proteinidentifikation mittels MS/MS nutzt die Information, die durch Fragmentierung eines Peptids durch CID erzeugt wird. Die Datenbanksuche wird mit Hilfe eines Algorithmus durchgeführt, der die experimentellen Daten den berechneten Daten einer Proteindatenbank zuordnet, bis das Spektrum der Aminosäuresequenz entspricht. Weiterhin wendet der Algorithmus Spaltungsregeln desjenigen Enzyms an, das für die Proteolyse der Proteine verwendet wurde. Die meist genutzten Programme für die Zuordnung der Spektren zu theoretischen Daten sind Mascot und Sequest.

Die Identifizierung von Proteinen nach Trypsinverdau wurde mit einem 4800 MALDI ToF/ToF Analyzer der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die trypsinierten Proteinlösungen wurden zunächst durch Zugabe von je 2 µl Matrixlösung (50 % ACN und 0,1 % TFA) 10 min unter Schütteln angesäuert. 0,8 µl des Verdau wurden auf einer staubfreien metallischen Analyseplatte aufgebracht und anschließend 0,4 µl Matrixlösung zugefügt. Die Matrixlösung setzte sich aus 5 mg/ml

CCA in 50 % ACN und 0,1 % TFA zusammen. Die Standard-Kalibrierung erfolgte vor dem Start der Messungen mit Angiotensin. Ausgehend vom MS Spektrum wurden in einer kombinierten MS/MSMS jeweils die fünf stärksten „Precursor“ pro Spot weiter fragmentiert. Die wichtigsten Parameter-Einstellungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Verwendete Einstellungen des „MALDI ToF/ToF Analyzers“.**

Massenbereich	950 – 4000 Da
„Shots“ Subspektrum	50
Gesamt-„Shots“	1500
Fixe Laserintensität	5888
min S/N („signal/noise“)	10

Zur Identifizierung der Proteine wurden die durch MALDI-ToF/ToF erhaltenen Spektren in die Datenbank MASCOT<sup>®</sup> v 2.1 eingegeben und mittels GPS Explorer<sup>™</sup> Software (Applied Biosystems) ausgewertet. Es wurde eine kombinierte Suche mit MS und MS/MS-Daten durchgeführt, wobei die Daten mit der Datenbank NCBI „yeast“ bzw. „fungi“ abgeglichen wurden.

## 5 Hefespezifische Methoden

### 5.1 Zellzahlbestimmung

#### 5.1.1 Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Hefekultur erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer mit 0,1 mm Kammertiefe. Die Zellen wurden mit PBS 1:20 verdünnt und zu je fünf Gruppenquadraten ausgezählt. Die Gesamtzellzahl (GZZ) pro ml errechnet sich durch folgende Gleichung:

$$\text{GZZ/ml} = \text{Zellzahl in 5 Quadraten} \times 10^6 \times 20^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 5.1.2 Optische Dichte

Die optische Dichte von Hefekulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm mit dem Spektrometer U-1100 (Fa. Hitachi) gemessen. Als Referenz diente das entsprechende unbeimpfte Medium. Die zur Messung eingesetzten Küvetten besaßen eine Schichtdicke von 1 cm.

### 5.2 Assay zur Quantifizierung der *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$

Um die Toxizität der verschiedenen K28 $\alpha$ -Varianten nach intrazellulärer Expression bzw. die Sensitivität der getesteten Wildtyp- und Deletionsstämme gegenüber der intrazellulären Expression dieser Toxinkonstrukte besser vergleichen zu können, wurde ein Wachstumstest durchgeführt. Dazu wurden jeweils mindestens drei Klone der mit dem Letalkonstrukt und K28ppto $\alpha$  als Kontrolle transformierten Hefestämme in entsprechendem Selektionsmedium mit Raffinose als Kohlenstoffquelle üN angezogen und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl/ml bestimmt (siehe Punkt 5.1.1). Nach der Ernte von je  $1 \times 10^7$  Zellen wurde das Zellpellet in 50  $\mu$ l Raffinose-Medium aufgenommen und in fünf 10er-Schritten eine

Verdünnungsreihe der Zellsuspensionen hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 5 µl auf Selektionsagar getropft – parallel auf eine Platte mit Glukose (reprimierend) und Galaktose (induzierend) als C-Quelle. Nach fünftägiger Inkubation der Platten bei 30°C kann das Wachstum der Zellen in den einzelnen Verdünnungsstufen zur relativen Quantifizierung der Toxizität herangezogen werden.

### **5.3 Zellaufschluss von Hefen**

#### **5.3.1 Glasperlen-Aufschluss**

Zunächst wurde das Nassgewicht der Hefen bestimmt. Pro g Zellen wurden 10 g Glasperlen (Größe: 25-30 µm; Firma Roth) sowie 3 ml Isolierungspuffer eingesetzt. Der Aufschluss erfolgte durch zehnmaliges Vortexen für jeweils 1 min, unterbrochen durch jeweils einminütige Inkubation auf Eis. Alternativ kam eine Schwingmühle zum Einsatz (4 x 20 s). Nach dem Aufschluss wurden die Glasperlen mit Isolierungspuffer gespült und die erhaltenen Überstände vereint. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer wurden die Proteine des erhaltenen Zellextraktes durch Fällung mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (im Verhältnis 1:9) bei -20°C konzentriert.

#### **5.3.2 S80-Schnellaufschluss**

Für den Hefe-Schnellaufschluss wurden  $3 \times 10^8$  Zellen einer frischen ü.N. Kultur 5 min bei 9.000 Upm pelletiert und in 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen (Powilleit, 2004). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und eine Stunde bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese mit 50 µl 3x SDS-Ladepuffer versetzt und nach kurzem Vortexen 5 min bei 95°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch zweiminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und zur SDS-PAGE eingesetzt.

## 5.4 Sphäroplastierung

### Sphäroplastierungspuffer

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

DTT wurde nach dem Autoklavieren des Puffers aus einer 2 M Stammlösung hinzugegeben. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert und Zymolyase sowie DTT erst bei Gebrauch hinzugefügt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

In osmotisch stabilisiertem Medium können durch enzymatischen Verdau der Hefezellwand in Kombination mit chemischen Vorgängen sphäroplastierte Hefezellen gewonnen werden. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine von Zhu und Bussey (1989) entwickelte Methode, bei welcher das Enzym Zymolyase zum Einsatz kommt. Diese  $\beta$ -1,3-Glukan-Laminaripentaonase hydrolysiert Glukose-Polymere, die an  $\beta$ -1,3-Glukane der Zellwand gebunden sind und erreicht somit die Destabilisierung und den Abbau der Zellwand. Der zusätzliche Einsatz von DTT führt zur Reduktion von Disulfidbrücken. Dazu wurden 200 ml YEPD-Medium mit Hefen aus einer frischen Vorkultur 1 %-ig beimpft und über Nacht auf dem Schüttler (30°C, 220 Upm) bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (Zellzahl 1 bis  $5 \times 10^7$ /ml) kultiviert, danach wurden sie geerntet (10 min, 6.000 Upm) und mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml Sphäroplastierungspuffer, welchem 200 µg/ml Zymolyase und 2 mM DTT frisch zugesetzt wurden, aufgenommen und ein bis zwei Stunden bei 30°C unter leichtem Schütteln (90 Upm) inkubiert. Der Erfolg der Sphäroplastierung wurde mikroskopisch durch Zugabe von Wasser oder 10 % SDS überprüft.

90 % der Hefen sollten durch Wasserzugabe lysieren. Sphäroplastierte Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 2.000 Upm) und zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen, um Zymolyase sowie DTT-Reste zu entfernen.

## 5.5 Zellfraktionierung

### Inkubationspuffer

Sorbit	800 mM
Tris-HCl, pH 4,7	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glukose	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 4,7 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### Lysepuffer

Sorbit	200 mM
Hepes-KOH, pH 7,0	20 mM
Kaliumacetat	50 mM
EDTA	2 mM

Vor Gebrauch wurden Protease-Inhibitoren zugegeben.

Die Zellfraktionierung wurde nach einer von Eisfeld (Eisfeld, 2001) modifizierten Methode nach Bryant (Bryant *et al.*, 1998) durchgeführt. Die Hefen wurden wie unter Punkt 5.4 beschrieben sphäroplastierte und nach Waschschrinen in Inkubationspuffer in 1 ml eiskaltem Lysepuffer aufgenommen. Um zu untersuchen, ob K28-Toxin in verschiedenen Hefedeletionsmutanten in bestimmten Kompartimenten akkumuliert, wurden die sphäroplastierte Zellen zunächst zwei Stunden in 10 ml Inkubationspuffer pH 4,7 mit 20% K28 Toxinkonzentrat bei 20°C inkubiert. Der Aufschluss der Sphäroplasten erfolgte mechanisch durch Einsatz eines „Dounce“-Homogenisators, während die Apparatur auf Eis gekühlt blieb. Durch gleichmäßige Auf- und Abwärtsbewegungen werden die Sphäroplasten geschert und bersten schließlich.

Bei dieser Methode bleiben die Organellen in einem möglichst intakten Zustand zurück. Die daran anschließenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und die resultierenden Fraktionen sofort bei -20°C eingefroren. Im ersten Schritt wurde das Lysat fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert, wodurch Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene, intakte Zellen sedimentiert wurden (Pellet 1, P1). Der Überstand wurde im nächsten Schritt 15 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert, so dass im resultierenden Pellet überwiegend Membranfragmente von größeren Organellen, wie Cytoplasmamembran, ER, Golgi und Vakuolen vorhanden sein sollten (Pellet 2, P2, Membranfraktion). Der Überstand wurde schließlich 60 Minuten bei 100.000 g in einer Optima™ MAX Ultrazentrifuge der Firma Beckman Coulter (Rotor: MLS-50, 30.500 Upm) zentrifugiert. Das aus dem letzten Schritt resultierende „Highspeed“-Pellet (Pellet 3, P3 Vesikelfraktion) enthielt Vesikel, Endosomen und Golgi-Bestandteile.

**Tabelle 10: SDS-Probenvorbereitung** und eingesetzte Volumina sowie Probenpuffer der verschiedenen Ansätze der Zellfraktionierung

Fraktion	Aufbereitung	Probevolumen	SDS-Probenpuffer (2x)
P1 Zelltrümmerfraktion	-	5 µl	10 µl
P2 Membranfraktion	in 100 µl H <sub>2</sub> O/PI resuspendiert	15 µl	10 µl
P3 Vesikelfraktion	in 50 µl H <sub>2</sub> O/PI resuspendiert	25 µl	20 µl
C Cytoplasmافرaktion	Acetonfällung Pellet in 200 µl H <sub>2</sub> O/PI resuspendiert	25 µl	20 µl

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, da das Pellet nur sehr locker am Boden des Zentrifugenröhrchen vorlag. Der Überstand enthält alle löslichen Cytoplasmaproteine (C, Cytoplasmافرaktion). Der gesamte Überstand wurde mit Ethanol bzw. einem Acton/Methanol-Gemisch (1:9) über Nacht bei -20°C gefällt. Am folgenden Tag wurden

die ausgefällten Proteine 20 Minuten bei 15.000 Upm und 4°C sedimentiert und in 200 µl Aqua dest., welchem Proteaseinhibitor zugesetzt wurde, aufgenommen. Die Fraktionen wurden wie in Tabelle 9 beschrieben zur SDS-Gelelektrophorese vorbereitet.

## **5.6 Herstellung von Toxinkonzentrat**

Die Herstellung des K28-Toxinkonzentrates erfolgte mittels Ultrafiltration über eine 10 kDa Membran einer Ultrafiltrationszelle der Firma Amicon bei einem N<sub>2</sub>-Druck von 2 bar. Zur Benetzung wurde die Membran zunächst 20 Minuten mit Wasser unter geringer Druckzufuhr (0,5 bar) gespült. Bei kleinen Ansätzen (<25 ml Volumen) wurden die Zentrifugeneinheiten Vivaspin (10 kDa Ausschlussgrenze; Vivascience Sartorius group) eingesetzt (vgl. Anleitung des Herstellers). Zur Herstellung des Toxinkonzentrates diente der K28-Superkiller MS300b, welcher über 4 d bei 20°C unter leichtem Rühren in B-Medium mit pH 4,7 angezogen wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (7.000 Upm, 20 min, 4°C), der zellfreie Überstand mit Hilfe der „Watson Marlow 6035“-Pumpe mit 1 bar Druck bei 4°C über die Sartorius-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa filtriert. Auf diese Weise wurden 20 L Kulturüberstand auf etwa 900 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde erneut 20 min bei 7.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand unter Vakuum über einen Membranfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Das Filtrat wurde anschließend unter Benutzung einer Amicon-Ultrafiltrationszelle über einen 10 kDa Filter aus regenerierter Zellulose (Fa. Millipore) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 4°C auf ein Volumen von 80 ml eingengt und sterilfiltriert. Die Aktivität des Toxinkonzentrates wurde im MBA gegen sensitive Hefezellen bestimmt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

## 5.7 Agardiffusionstest

Der Nachweis der Killertoxin-Aktivität erfolgte im Agardiffusionstest auf Methylenblauagar (MBA-Test). Methylenblau ist ein spezifischer Farbstoff, der in tote Zellen eindringt und diese blau färbt. Jeweils  $1 \times 10^6$  ( $5 \times 10^5$ ) Zellen des zu testenden *S. cerevisiae*-Stammes wurden in 15 (7,5) ml verflüssigten und auf 48°C abgekühlten Agar (pH 4,7) eingebettet. Mit Hilfe eines Korkbohrers mit einem Durchmesser von 1 cm wurden Löcher ausgestanzt, in welche 100 µl der Toxinpräparate pipettiert wurden. Während das Toxin langsam in den umliegenden Agar diffundiert, nimmt die Konzentration des eingesetzten Toxins entlang der Diffusionsstrecke logarithmisch ab. Nach dreitägiger Bebrütung der Platten bei 20°C wurde die Killer-Aktivität anhand des zellfreien Hemmhof-Durchmessers bestimmt.

## 6 Material

### 6.1 Antikörper

**Tabelle 11: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper**

Antikörper	Organismus	Bezugs- quelle	Bemerkungen	Verwendung
<b>Primäre Antikörper</b>				
anti-K28 $\alpha$	Rabbit	BioGenes GmbH	Antikörper- serum	WB, IP
anti-K28 $\beta$	Rabbit	BioGenes GmbH	Antikörper- serum	WB
anti-K28	Rabbit	BioGenes GmbH	Antikörper- serum	WB, IP
anti-FLAG- M1	Mouse	Sigma	monoklonal; bindet spezifisch freien N-Terminus von FLAG	WB
anti-FLAG- M2	Mouse	Sigma	monoklonal	WB, IF
anti-V5	Mouse	Serotec	monoklonal	WB
anti- Ubiquitin	Mouse	Santa Cruz Techn.	monoklonal	WB
<b>Sekundäre Antikörper</b>				
anti-Mouse		Sigma	HRP-gekoppelt	WB
anti-Rabbit		Sigma	HRP-gekoppelt	WB
anti-Rabbit		Sigma	AP-gekoppelt	WB
anti-Mouse		Sigma	AP-gekoppelt	WB

## 6.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

**Tabelle 12: Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits** wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Firma (Firmensitz)	Produkte
5 Prime (Hamburg)	Taq DNA-Polymerase
Amersham Biosciences (Oslo, Norwegen)	Methyl ( <sup>3</sup> H) Thymidin
AppliChem (Darmstadt)	T4 DNA-Ligase, -puffer
BioRad (München)	Elektroporationsküvetten
Biozym (Oldendorf)	Agarose
Difco (Detroit, USA)	YNB ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat
Eppendorf (Hamburg)	“Perfectprep Gel Cleanup”
Eurogentec (Seraing, B)	“smart ladder”, DNA-Marker
Fermentas (St. Leon-Rot)	DNase freie RNase Restriktionsenzyme T4 DNA-Ligase, -puffer PageRuler prestained
Fluka (Seelze)	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid p.a.
GE Healthcare (München)	Protein A Sepharose CL-4B [ <sup>14</sup> C] protein molecular weight marker CFA75G Immobiline <sup>TM</sup> Dry Strip pH 4-7 18cm CyDye DIGE Fluor Cy2/Cy3/Cy5 Pharmalyte 3-10
Invitrogen (Karlsruhe)	“TOPO pYES2.1 Expression Kit”
Marcor (New Jersey, USA)	Agar, Trypton, Pepton, Hefeextrakt
Millipore (Eschborn)	Dialysefilter
Neuss & Wilke GmbH (Gelsenkirchen)	Dextrose
OMEGA bio-tek (Norcross, USA)	“E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit”

Firma (Firmensitz)	Produkte
PeqLab (Erlangen)	“E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II”
Perkin Elmer (Waltham, USA)	[ <sup>36</sup> S]Methionin Leucin L (3,4,5)- <sup>3</sup> H(N), Emulsifier Safe
Pharmacia (Erlangen)	“GeneQuant”
Promega (Mannheim)	Sequencing Grade Modified Trypsin Riboprobe <sup>®</sup> System-T7 Wheat germ extract system
Roche Diagnostics (Mannheim)	Taq DNA-Polymerase, -puffer Restriktionsenzyme „Expand <sup>™</sup> High Fidelity PCR System“ Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film
Serva (Heidelberg)	β-Mercaptoethanol DMSO
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Ampicillin Bromphenolblau TEMED Lachs-Sperma-DNA Formalin 10 %, neutral buffered
Thermo Scientific	SuperSignal <sup>®</sup> West Dura Restore <sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer
Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe)	Alle weiteren Chemikalien

### III Ergebnisse

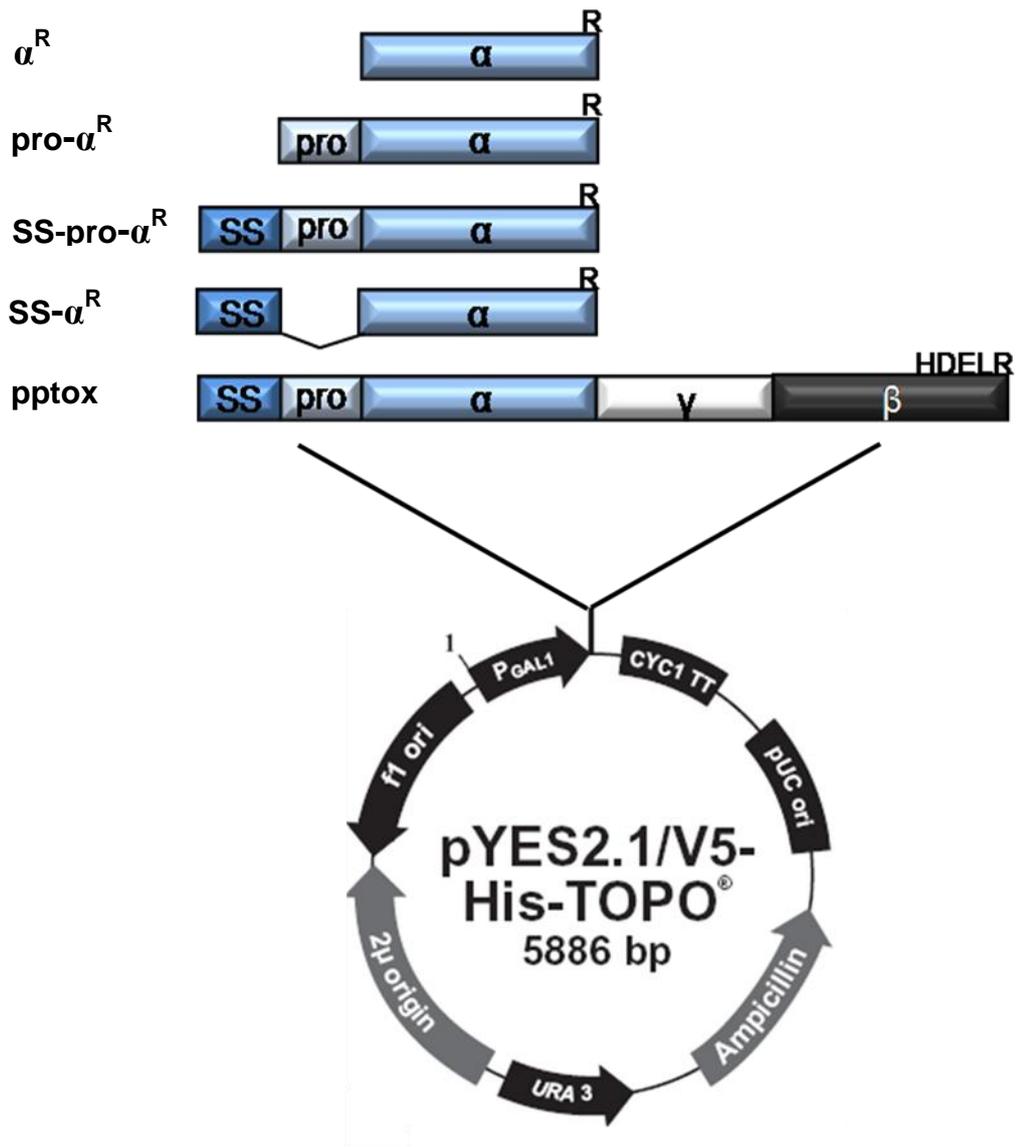
Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des intrazellulären Transportweges des viralen Killertoxins K28 in Hefe, insbesondere in Hinblick auf dessen Retrotranslokation vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Cytosol. Der experimentelle Ansatz basierte auf einer früheren Beobachtung von Sendzig, dass die intrazelluläre Expression einer K28 $\alpha$ -Variante mit dem natürlichen, Toxin-eigenen Sekretionssignal (SS) in sensitiven Hefen einen Selbstkillerphänotyp hervorruft und die Ausbildung apoptotischer Marker induziert (Sendzig, 2003; Reiter, 2004). Eine Sekretion dieser K28 $\alpha$ -Derivate ins Kulturmedium konnte hingegen nicht beobachtet werden. Aus diesem Suizid-Phänotyp muss somit zwangsläufig geschlossen werden, dass die toxische  $\alpha$ -Untereinheit nach *in vivo* Expression des K28 $\alpha$ -Derivates SS-pro- $\alpha^R$  der Sekretion entgeht und stattdessen einen Weg zurück ins Cytosol findet, von wo aus sie die Toxizität in den Zellkern vermitteln kann. Demzufolge stellt die Plasmid-getriebene intrazelluläre Expression eines solchen K28-Letalkonstruktes in Hefe ein geeignetes Testsystem dar, um den Export des Toxins aus dem Sekretionsweg ins Cytosol näher zu untersuchen und am Transport beteiligte Komponenten zu identifizieren.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollten mit Hilfe einer Proteom-Analyse sensitiver, Toxin-behandelter Hefen zelluläre Proteine identifiziert werden, deren Expressionsmuster im Vergleich zu einer unbehandelten Hefe verändert ist. Proteine, die aufgrund der K28-Behandlung spezifisch hoch- oder runter reguliert werden, könnten neue Einblicke in den Wirkmechanismus des Toxins gewähren und Informationen über mögliche zelluläre Interaktionspartner von K28 liefern.

## 1. Konstruktion verschiedener K28 $\alpha$ -Varianten zur Aufklärung des intrazellulären Toxintransportes in sensitiven Hefen

Wie bei den meisten A/B-Toxinen reicht vermutlich auch bei K28 bereits eine geringe Anzahl an Toxinmolekülen in der Zelle aus, um diese abzutöten, so dass es sich generell als schwierig gestaltete, K28 $\alpha$ -Derivate nach intrazellulärer Expression im Cytosol sensitiver Hefen nachzuweisen. Da die zur Verfügung stehenden polyklonalen Antikörper, die gegen das Toxin beziehungsweise seine  $\alpha$ -Untereinheit gerichtet sind, keine ausreichende Spezifität besaßen, konstruierte Sendzig cmyc-getaggte K28 $\alpha$ -Derivate. Auf diese Weise gelang es schließlich, die cytosolische Variante  $\alpha^R$  (mit C-terminalem Arginin-Rest als potenzielle Kex1p-Schnittstelle) im Zelllysat nachzuweisen (Sendzig, 2006). Eine entsprechende Variante mit natürlicher Signalsequenz (SS-pro- $\alpha^R$ ) konnte indessen nicht nachgewiesen werden – weder im Zelllysat noch im zellfreien Kulturüberstand. Mit Hilfe einer von Sendzig durchgeführten Plasmidisolierung konnte jedoch das Vorhandensein des K28 $\alpha$ -kodierenden Inserts in den Hefetransformanten bestätigt werden (Sendzig, 2006). In dieser Arbeit wurde nun eine Reihe verschiedener, teils getaggtter, K28 $\alpha$ -Derivate synthetisiert, die zum intrazellulären Nachweis der  $\alpha$ -Untereinheit und zum „Screening“ von Hefe-Deletionsmutanten dienen sollten. Ein zusätzlicher Vergleich der Toxizität der unterschiedlichen Derivate sollte die Bedeutung einzelner Toxin-Komponenten sowie möglicher posttranslationaler Modifikationen oder Prozessierungsschritte innerhalb des Sekretionsweges aufklären, um auf diese Weise ein detaillierteres Bild vom intrazellulären Transport des Toxins zu erhalten.

Die in Abbildung 8 schematisch dargestellten K28 $\alpha$ -Derivate  $\alpha^R$ , pro- $\alpha^R$ , SS- $\alpha^R$  sowie SS-pro- $\alpha^R$  wurden mit Hilfe der PCR unter Einsatz sequenzspezifischer Primer amplifiziert. Die Konstrukte  $\alpha^R$  und SS-pro- $\alpha^R$  sowie das Vorläufertoxin ptox stammten aus der Arbeit von Sendzig und lagen bereits kloniert im gleichen Grundvektor vor (2003). Die Amplifizierung des K28-Derivates pro- $\alpha^R$  erfolgte mit Hilfe der Primer 2 und 3 aus dem Vektor pPGK-M28-I, der das Gen für das K28-Präprotoxin enthält. Die gewählten PCR-Bedingungen und die Zusammensetzung des Ansatzes sind unter Punkt 3.8 (Material und Methoden) aufgeführt. Das Konstrukt SS- $\alpha^R$  wurde ausgehend von demselben „Template“ in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen amplifiziert, da die prä-Sequenz für einen einzigen Primer zu lang war (erste PCR mit Primern 5+3; zweite PCR mit Primern 1+3). Alle Konstrukte dieser Arbeit wurden in den Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen) einkloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Insertion mittels *Taq*-Polymerase amplifizierter PCR-Produkte über die durch die Polymerase erzeugten A-Überhänge. Die TOPO-Klonierung stellt somit eine einfache und elegante Methode dar, um PCR-Produkte schnell und ohne vorherigen Restriktionsverdau in den entsprechenden Vektor einzubringen. Zudem hat dieses Vektorsystems den Vorteil, dass das Insert direkt mit Hilfe kommerziell erhältlicher (*GAL1*- und V5-spezifischer) Primer sequenziert werden kann. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten „Shuttle“-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> stehen die Toxinvarianten unter Transkriptionskontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors. Nach der Transformation der Plasmid-DNA korrekt sequenzierter Klone in Hefe konnte die intrazelluläre Expression der K28 $\alpha$ -Derivate somit durch Wechsel der Kohlenstoffquelle beliebig induziert (Galaktose) oder reprimiert (Glukose) werden. Die Transformation erfolgte zunächst in die sensitive Hefe BY4742. Dieser Stamm wurde ausgewählt, da es sich hierbei um den isogenen Wildtyp zu den später getesteten Deletionsmutanten handelt.

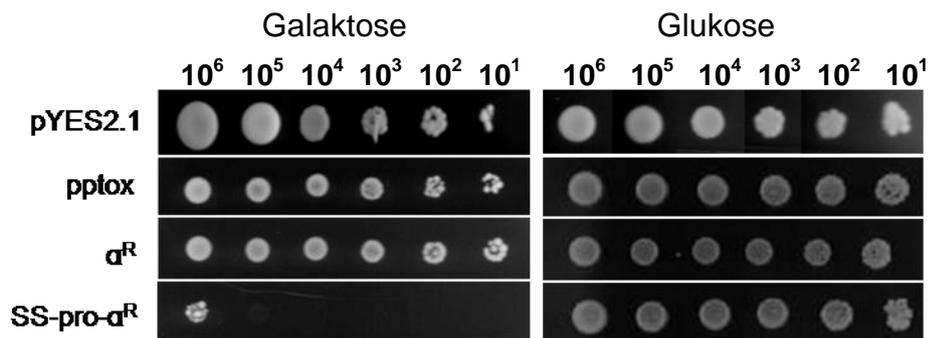


**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der konstruierten K28 $\alpha$ -Varianten zur Untersuchung der Bedeutung der N-terminalen Signalsequenz (SS) sowie der pro-Region des  $\alpha/\beta$ -Toxins für die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$ . Das Konstrukt SS-pro- $\alpha^R$  besteht aus der K28-eigenen Signalsequenz, die den posttranslationalen ER-Import steuert, der pro-Region sowie der Toxizität vermittelnden Toxinkomponente  $\alpha$ , welche C-terminal als potenzielle Kex1p-Schnittstelle einen Arginin-Rest trägt. Alle Konstrukte wurden mit sequenzspezifischen Primern (Details siehe Material und Methoden, Tab. 5) mittels PCR amplifiziert und anschließend über TOPO-Klonierung in den „high-copy“-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO® (Fa. Invitrogen) kloniert. Da die Konstrukte unter der Transkriptionskontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors  $\text{P}_{\text{GAL1}}$  stehen, erlaubt dieser „Shuttle“-Vektor gleichzeitig die Expression der Toxinvarianten in Hefe. K28- $\alpha^R$  und SS-pro- $\alpha^R$  stammen aus der Arbeit von Sendzig (Sendzig, 2003). Als „Template“ diente jeweils der Vektor pPGK-M28-I, welcher die kodierende Sequenz für den Toxinvorläufer K28-pptox enthält.

## 2. Nachweis der *in vivo* Cytotoxizität der hergestellten K28 $\alpha$ -Derivate nach Expression in Hefe

Zunächst sollte getestet werden, ob die hergestellten Toxin-Derivate auf die K28-sensitive Wildtyp-Hefe BY4742 toxisch wirken und einen Selbstkillerphänotyp induzieren. Um die Bedeutung der pro-Region und des Sekretionssignals (SS) für die *in vivo*-Toxizität von K28 $\alpha$  zu verstehen, war es erforderlich, auch geringste Toxizitäts-Unterschiede der verschiedenen K28 $\alpha$ -Varianten sichtbar zu machen. Hierbei erwies sich ein *in vivo* Wachstumstest als geeignet, um das Absterben einer transformierten Hefe nach *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  zu ermitteln. Nach Transformation des Wildtyp-Stammes BY4742 mit entsprechenden K28 $\alpha$ -Derivaten wurden die Transformanten über Nacht in *ura* d/o Raffinose-Medium angezogen. Zur Anzucht der Hefen wurde Raffinose als Kohlenstoffquelle ausgewählt, um eine Katabolitrepression zu vermeiden, die bei „Shiften“ der Zellen von Glukose auf Galaktose auftritt. Von mindestens drei verschiedenen Transformanten wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen geerntet und parallele Verdünnungsreihen hergestellt (Details siehe Material und Methoden, Punkt 5.2). Jeweils 5  $\mu$ l jeder Verdünnungsstufe wurden parallel auf Selektionsagar mit 2% Galaktose (Induktion der Expression) und zur Kontrolle auf Agar mit 2% Glukose getropft. Nach fünftägiger Bebrütung der Platten bei 30°C wurde das Wachstum der Transformanten in den einzelnen Verdünnungsstufen nach Induktion untersucht. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abbildung 9 dargestellt. Wie erwartet zeigte die Vektorkontrolle (d.h. Zellen, die mit dem pYES2.1-Leervektor transformiert wurden) normales Wachstum unter induzierenden Bedingungen. Die intrazelluläre Expression des K28-Toxinvorläufers pptox war ebenso wenig toxisch für die Zelle, da das Präprotoxin nach Eintritt in den Sekretionsweg in das Kulturmedium sezerniert wird und der Transformante gleichzeitig Immunität gegen ihr eigenes Toxin verleiht (Breinig *et al.*, 2006). Interessanterweise führte selbst die Expression der toxischen Komponente K28- $\alpha^R$  im Cytosol der

sensitiven Hefe nicht zu einer Abtötung. Lediglich die Toxinvariante SS-pro- $\alpha^R$  mit N-terminalem Sekretionssignal rief einen Selbstkillerphänotyp hervor, der dadurch gekennzeichnet war, dass nur vereinzelt Zellen der ersten Verdünnungsstufe ( $1 \times 10^6$ ) überlebten. Somit konnten die Ergebnisse von Sendzig bestätigt werden, dass die cytosolische Expression von K28 $\alpha$  alleine nicht toxisch für eine sensitive Zielzelle ist.

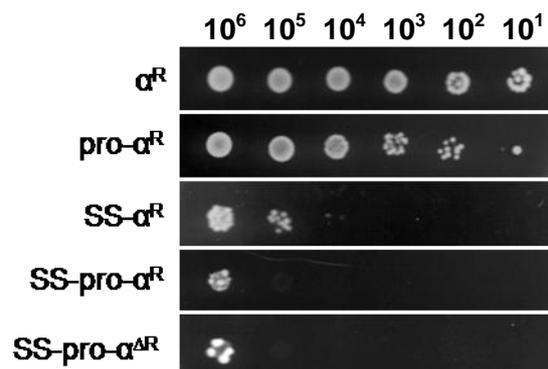


**Abbildung 9: Wachstumstest von Hefetransformanten zum Nachweis der Cytotoxizität verschiedener K28 $\alpha$ -Varianten.** Der sensitive Wildtyp-Stamm BY4742 wurde mit unterschiedlichen K28 $\alpha$ -Derivaten transformiert. Die Toxin-Konstrukte lagen im TOPO-Vektor pYES2.1 unter der Transkriptionskontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors  $P_{GAL1}$  vor. Die Transformanten wurden ü.N. in ura-d/o-Medium mit Raffinose angezogen und in einer logarithmischen Verdünnungsreihe (1:10) zu jeweils 5  $\mu$ l parallel auf Selektionsagar mit Galaktose (induzierte Expression; links) und Glukose (reprimierte Expression; rechts) aufgetropft. Die Platten wurden 5 Tage bei 30°C bebrütet, und anschließend ausgewertet. Als Negativkontrolle diente eine Transformante mit pYES2.1-Leervektor.

### 3. Toxin-Eintritt in das ER ist Voraussetzung für die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$

#### 3.1 Die *in vivo* Expression von K28 $\alpha$ -Varianten mit N-terminalem Sekretionssignal verursacht einen Selbstkillerphänotyp

Zunächst sollte nachgewiesen werden, ob die Toxizität des K28-Derivates SS-pro- $\alpha^R$  tatsächlich auf dessen N-terminale hydrophobe Signalsequenz und den damit verbundenen ER-Import zurückzuführen ist und nicht etwa auf das Vorhandensein der pro-Region, dessen Funktion bislang nicht geklärt ist. Dazu wurden zwei weitere K28 $\alpha$ -Varianten mit Sekretionssignal in der Wildtyphefe BY4742 exprimiert und deren Fähigkeit zur Ausbildung eines Suizid-Phänotyps untersucht (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: K28 $\alpha$ -Varianten mit N-terminalem Sekretionssignal induzieren einen Selbstkillerphänotyp.** Der sensitive Wildtyp-Stamm BY4742 wurde mit unterschiedlichen K28 $\alpha$ -Varianten transformiert. Die Toxin-Konstrukte befanden sich im TOPO-Vektor pYES2.1 unter der Transkriptionskontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors  $P_{GAL1}$ . Details zur Durchführung des Wachstumstests sind in Abb. 9 erläutert.

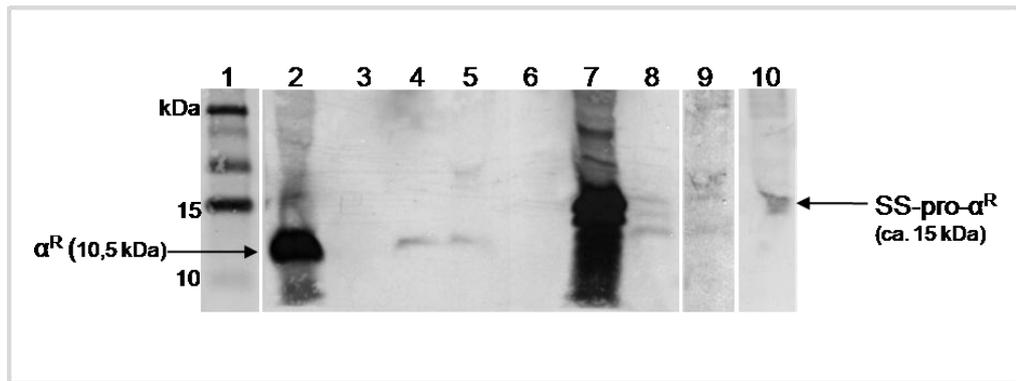
Das Ergebnis dieses Toxizitäts-Assays demonstriert deutlich die Signifikanz des Signalpeptids für die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$ . Die beiden cytosolischen Varianten  $\alpha^R$  und pro- $\alpha^R$  waren wiederum nicht in der Lage, einen „Selbstmord“ der produzierenden Zelle zu induzieren. Im Gegensatz dazu töteten alle Varianten mit N-terminaler Signalsequenz die transformierte Hefe ab. Auffallend war, dass das ER-luminale Konstrukt SS- $\alpha^R$ , dem die pro-Region fehlt, im Vergleich zum

Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  eine leicht verminderte Cytotoxizität aufwies. Die Deletion des  $\alpha$ -C-terminalen Arginin-Restes hingegen schien keine Auswirkung auf die *in vivo* Toxizität zu haben. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte nun experimentell untersucht werden, ob tatsächlich ein Import in den Sekretionsweg stattfindet und ob dieser für die Cytotoxizität von K28 $\alpha$  notwendig ist. Daneben wäre denkbar, dass die im Cytosol exprimierte  $\alpha$ -Untereinheit zwar ihre toxische Konformation besitzt, aber einer schnellen Degradation unterliegt und daher keinen Selbstkillerphänotyp erzeugen kann. Da es bislang nicht möglich war, K28 $\alpha$  in ungetaggeter Form mittels Western Blot im Cytosol einer produzierenden Zelle nachzuweisen, wurde im Folgenden eine sensitivere Methode zum Nachweis von *in vivo* translatierten Proteinen gewählt.

#### **4. Nachweis der toxischen $\alpha$ -Untereinheit im Zelllysat sensitiver Hefen nach radioaktiver Markierung („Pulse“)**

Das *in vivo* „Pulse-Labeling“ neu synthetisierter Proteine mit [ $^{35}\text{S}$ ]-markiertem Methionin und anschließende Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern erlaubt aufgrund der radioaktiven Markierung einen sehr effizienten Nachweis selbst geringer Proteinmengen im Zelllysat. Zunächst wurden die nachzuweisenden Konstrukte  $\alpha^R$  und SS-pro- $\alpha^R$  als *EcoRI/BglII*-Fragmente in den Vektor pGEM1 umklontiert (für Vektordetails siehe Material und Methoden, Abbildung 2), wo sie unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen. Dieser erlaubt die *in vitro* Transkription der K28 $\alpha$ -Derivate mit Hilfe des Riboprobe<sup>®</sup> System-T7 der Firma Promega. Die *in vitro* synthetisierte mRNA wurde anschließend mit Hilfe eines Weizenkeim-Translationssystems *in vitro* translatiert und durch Einbau von [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin radioaktiv markiert. Eine solche *in vitro*-Translation ist sinnvoll, da sie nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel zur Größenabschätzung der *in vivo* translatierten Produkte herangezogen werden kann. Das erleichtert zudem den

Nachweis möglicher posttranslationaler Modifikationen. Die Details zur Durchführung der *in vitro* Transkription und Translation sind unter Punkt 3.11 und 4.4 (Material und Methoden) beschrieben. Für den Nachweis der intrazellulär exprimierten K28 $\alpha$ -Konstrukte wurde die Wildtyp-Hefe BY4742 mit pYES2.1/ $\alpha^R$  bzw. pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert und die Transformanten ü.N. in Selektionsmedium mit 2% Raffinose angezogen. Die OD<sub>600</sub> wurde spektrometrisch bestimmt und daraus die Gesamtzellzahl abgeleitet. Jeweils  $1,5 \times 10^8$  Zellen wurden pelletiert, in einem Milliliter *ura* d/o-Medium mit Galaktose aufgenommen und die Expression vier Stunden induziert. Durch anschließende Inkubation *in ura* met d/o Medium mit 2% Galaktose wurde den Zellen Methionin entzogen, so dass der Einbau des zugegebenen, radioaktiv markierten Methionins effizienter stattfindet und zugleich die Expression der Toxinkonstrukte induziert wird. Das eigentliche „Pulse-Labeling“ der synthetisierten Proteine erfolgte nach Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin über einen Zeitraum von einer Stunde. Anschließend wurden die Hefen aufgeschlossen, die Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand zur Immunpräzipitation eingesetzt. Zum Abfangen der K28 $\alpha$ -Derivate wurde das Zelllysat über Nacht mit K28-Antikörper-gekoppelten Sepharose A-„Beads“ inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die K28 $\alpha$ -Derivate durch reduzierenden SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C von den „Beads“ abgelöst und zusammen mit den *in vitro* translatierten Proben in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel analysiert. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und die Blots drei bis fünf Tage auf einem Röntgenfilm belassen, um eine ausreichende Signalstärke zu gewährleisten (Abbildung 11).



**Abbildung 11: „Pulse“-Experiment zum Nachweis der K28 $\alpha$ -Untereinheit im Zellaufschluss einer sensitiven Hefe.** Die *in vitro* translatierten K28 $\alpha$ -Konstrukte  $\alpha^R$  und SS-pro- $\alpha^R$  dienten als Größenvergleich der entsprechenden *in vivo* Proben. Zum *in vivo* Nachweis der translatierten K28 $\alpha$ -Derivate wurde die Wildtyp-Hefe BY4742 mit pYES2.1/ $\alpha^R$  bzw. pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Frische Transformanten wurden nach Anzucht in Selektionsmedium mit 2% Raffinose in Methionin-freiem Medium unter induzierenden Bedingungen inkubiert. Das *in vivo* „Pulse-Labeling“ von  $\alpha^R$  und SS-pro- $\alpha^R$  erfolgte mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin über einen Zeitraum von einer Stunde. Die markierten Toxinderivate wurden mittels Immunpräzipitation mit K28-Antikörper-gekoppelten Sepharose A-„Beads“ aus dem Zellysate isoliert und nach Zugabe von reduzierendem SDS-Probenpuffer in einem 10%-igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblotet und der Blot fünf Tage auf einem Röntgenfilm belassen.

#### Auftragschema:

- Spur 1: Protein-Standard, [ $^{14}\text{C}$ ]-Protein molecular weight marker, 10  $\mu\text{l}$
- Spur 2: *in vitro* Translation pGEM/ $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$
- Spur 4: *in vivo* Translation pYES2.1/ $\alpha^R$ , 0 h nach Induktion, 30  $\mu\text{l}$
- Spur 5: *in vivo* Translation pYES2.1/ $\alpha^R$ , 4 h nach Induktion, 30  $\mu\text{l}$
- Spur 7: *in vitro* Translation pGEM/SS-pro- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$
- Spur 8: *in vivo* Translation pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$ , 0 h nach Induktion, 30  $\mu\text{l}$
- Spuren 9+10: *in vivo* Translation pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$ , 4 h nach Induktion, 30  $\mu\text{l}$

Die in den Spuren 4 und 5 aufgetragenen [ $^{35}\text{S}$ ]-markierten Proben nach *in vivo* Translation von K28- $\alpha^R$  zeigten jeweils eine einzelne Bande auf der Höhe der entsprechenden *in vitro* translatierten K28 $\alpha$ -Untereinheit. Anhand des mitgeführten [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Protein-Standards ließ sich die Bandengröße auf etwa 11 kDa abschätzen. In den Spuren 8 bis 10 sind die *in vivo* Proben nach Translation von SS-pro- $\alpha^R$  aufgetragen. Hier waren zwei bzw. drei Banden erkennbar, wobei die obere Bande auf der Höhe der stärksten Bande der *in vitro* Probe (Spur 7) lag. Vermutlich handelte es sich bei dieser etwa 15 kDa großen Bande um das Vollängenkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$ . Zum Größenvergleich muss die

obere, stärkste Bande der *in vitro* Probe (Spur 7) herangezogen werden, da die schwächeren Banden bei der *in vitro* Translation durch Erkennung eines alternativen ATG-Codons als Translationsstart entstehen. Diese dürfen folglich nicht berücksichtigt werden. Die kleineren Banden der *in vivo* Proben deuten möglicherweise auf prozessierte Formen von SS-pro- $\alpha^R$  hin. Folglich gelang es mit Hilfe dieses „Pulse“-Experimentes sowohl die cytosolische ( $\alpha^R$ ) als auch die ER-luminale (SS-pro- $\alpha^R$ ) Variante von K28 $\alpha$  nach Galaktose-induzierter Expression im Zelllysat sensitiver Hefen nachzuweisen.

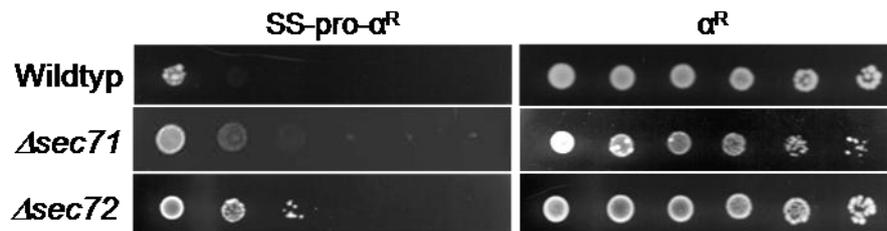
## **5. Untersuchungen zum intrazellulären Toxintransport von K28 $\alpha$**

### **5.1. Mutanten-Tests zum Nachweis des ER-Imports einer intrazellulär exprimierten K28 $\alpha$ -Variante mit Signalsequenz**

Eine mögliche Erklärung für die alleinige Toxizität von K28 $\alpha$ -Varianten mit N-terminaler Signalsequenz wäre, dass die  $\alpha$ -Untereinheit im Sekretionsweg einer Konformationsänderung und/oder posttranslationalen Modifikation unterliegt. Ohne diese Veränderungen ist K28 $\alpha$  möglicherweise nicht in der Lage, mit seinen Zielproteinen zu interagieren oder gar in den Zellkern einzudringen. Da bislang noch keine Angaben zur Struktur des K28-Toxins und insbesondere seiner cytotoxischen  $\alpha$ -Untereinheit vorliegen, ist noch unklar, ob und gegebenenfalls welche Modifikationen für die toxische Aktivität von  $\alpha$  erforderlich sein könnten. Bevor die  $\alpha$ -Untereinheit auf eine mögliche im ER erfolgende Konformationsänderung untersucht wurde, war es zunächst notwendig nachzuweisen, ob tatsächlich ein ER-Import der luminalen Variante SS-pro- $\alpha^R$  stattfindet. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Nullmutanten mit Defekt im ER-Import mit dem Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach Anschalten der Expression durch „Shift“ auf Selektionsagar mit 2% Galaktose wurden die Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, die *in vivo* Expression von

K28 $\alpha$  im ER zu überleben. Der ER-Import neu synthetisierter Proteine wird durch den Haupt-Translokation-Komplex Sec61 vermittelt, wobei hierbei zwei generelle Mechanismen unterschieden werden. Die meisten sekretorischen Proteine nutzen den SRP-abhängigen cotranslationalen ER-Import. Unmittelbar nach dem Start der Proteinsynthese dirigiert die ER-Signalsequenz das Ribosom zur ER-Membran und leitet dort den Transport der wachsenden Polypeptidkette ein. Das naszierende Protein wird direkt in den Sec61-Kanal eingefädelt, so dass es nicht mit dem Cytosol in Kontakt kommt. Die Faltung findet anschließend im ER-Lumen statt. Einige Präproteine, wie beispielsweise der Vorläufer des Hefe-Paarungsfaktors  $\alpha$ , pp $\alpha$ F, oder der Carboxypeptidase Y nutzen den posttranslationalen ER-Import (Hansen *et al.*, 1986; Waters und Blobel, 1986; Hansen und Walter, 1988). Sie werden im Cytosol vollständig synthetisiert und gelangen erst nach Ablösung vom freien Ribosom in das ER-Lumen. Dieser Prozess erfordert die Bindung der Polypeptidkette durch cytosolische Chaperone, die das Protein in einem entfaltenen Zustand halten und anschließend die Translokation über die ER-Membran vermitteln (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988). Ein Hydrophobizitäts-Plot von K28p $\alpha$  deutete auf einen posttranslationalen Import des K28-Toxinvorläufers hin (Eisfeld, 2001). Eine wichtige Rolle für die Translokation sekretorischer Proteine durch die ER-Membran spielt der Sec63-Komplex. Dieser Komplex besteht aus den beiden essenziellen Komponenten Sec63p und Sec62p sowie zwei nicht-essenziellen Untereinheiten Sec71p und Sec72p, wobei Sec63p vermutlich das für die Faltung zuständige BiP-Homolog Kar2p zum Translokation-Komplex rekrutiert (Brodsky und Schekman, 1993).  $\Delta$ sec71 und  $\Delta$ sec72 Nullmutanten verursachen die Akkumulation einer Vielzahl von Präproteinen *in vivo* (Feldheim *et al.*, 1993; Feldheim und Schekman, 1994). Sec72p vermittelt zudem den posttranslationalen ER-Import von pp $\alpha$ F in Proteoliposomen. Laut Feldheim und Schekman könnte Sec72p eine Funktion bei der Erkennung spezifischer Signalpeptide besitzen oder die Translokationseffizienz bestimmter sekretorischer Vorläufer durch

den Sec61-Importkomplex steigern (Feldheim und Schekman, 1994). In entsprechenden Hefe-Deletionsmutanten sollte somit der ER-Import der K28 $\alpha$ -Untereinheit mit Sekretionssignal gestört sein. Dies sollte sich in einer verminderten Sensitivität dieser Mutanten gegenüber der *in vivo* Expression des K28-Letalkonstruktes manifestieren, sofern tatsächlich der ER-Import für die Cytotoxizität der  $\alpha$ -Untereinheit notwendig ist.



**Abbildung 12: Mutanten mit Defekt im ER-Import überleben die *in vivo* Expression eines K28-Letalkonstruktes.** Die Hefe-Deletionsmutanten  $\Delta sec71$  und  $\Delta sec72$  sowie der isogene Wildtyp BY4742 wurden mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  und einer cytosolischen, nicht toxischen Variante  $\alpha^R$  als Negativkontrolle transformiert und die Transformanten im Wachstumstest auf ihre Sensitivität getestet (induzierende Bedingungen dargestellt).

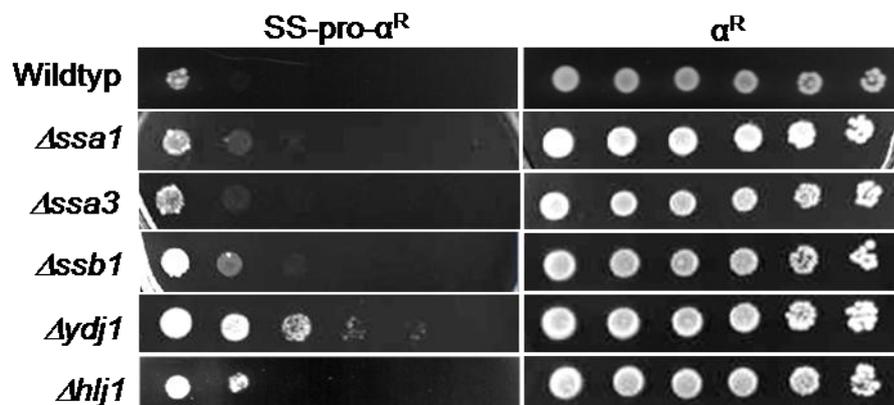
Wie aus Abbildung 12 zu erkennen ist, waren beide Mutanten nach Deletion der Gene *SEC71* und *SEC72* in der Lage, die *in vivo* Expression des Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  zu überleben, wobei  $\Delta sec72$  einen stärkeren Phänotyp zeigte. Selbst in der dritten Verdünnungsstufe mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  war noch Zellwachstum detektierbar, was auf eine verminderte Toxizität von K28 SS-pro- $\alpha^R$  hindeutet. Der eigentliche ER-Import erfolgt durch den Sec61-Translokon-Komplex, welcher sich bei *S. cerevisiae* aus der kanalbildenden Komponente Sec61p sowie zwei kleinen C-terminalen Ankerproteinen Sss1p und Sbh1p zusammensetzt (Wilkinson *et al.*, 1997). Der Sec63-Komplex bildet zusammen mit dem Sec61-Translokon eine funktionelle Einheit (Panzner *et al.*, 1995), wobei der Sec63-Komplex (ausgenommen Sec63p selbst) ausschließlich an der posttranslationalen Translokation beteiligt ist (Ng *et al.*, 1996; Brodsky *et al.*, 1995, Young *et al.*, 2001). Auch eine Rolle von Sec61p bei der ER-Retrotranslokation in das Cytosol der Zelle wird diskutiert (Römisch,

2005; Plemper *et al.*, 1997; Zhou und Schekman, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass die getesteten temperatursensitiven *sec61*-Mutanten (*sec61-2*, *sec61-3*) bereits nach Transformation und Expression der Kontrollkonstrukte K28 pptox bzw.  $\alpha^R$  einen starken Wachstumsdefekt aufwiesen, konnte keine Aussage über die Beteiligung von Sec61p getroffen werden. Auch Sendzig war es nicht gelungen, reproduzierbare Ergebnisse aus Wachstumstests der temperatursensitiven Mutanten zu erhalten, so dass im Folgenden darauf verzichtet wurde (Sendzig, 2006). Jedoch gelang es Nico Schäuble in seiner Diplomarbeit, mit Hilfe eines bimolekularen Komplementations-Assays eine direkte Interaktion zwischen SS-pro- $\alpha^R$  und Sec61p nachzuweisen (Schäuble, 2008). Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Interaktion beim ER-Import des Toxins oder während dessen Retrotranslokation stattfindet.

## 5.2 Untersuchung zur Beteiligung cytosolischer Chaperone am posttranslationalen ER-Import von K28 $\alpha$

Die Proteintranslokation in das ER-Lumen erfordert die Mithilfe einiger cytosolischer Chaperone. Von den beiden Klassen cytosolischer Hsp70 Chaperone der Hefe *S. cerevisiae*, die durch Gene der *SSA*- und *SSB*-Genfamilien kodiert werden (Boorstein *et al.*, 1994), sind vor allem die Ssb-Proteine an der Proteintranslation beteiligt (Pfund *et al.*, 1998). Chaperone der *SSA*-Genfamilie besitzen vielfältige Chaperon-abhängige Funktionen und werden neben der Degradation integraler Membranproteine auch für die posttranslationale Translokation in das ER benötigt. Beispielsweise konnte die Translokationsrate von pp $\alpha$ F in Anwesenheit von Ssa1p und Ssa2p um das Achtfache gesteigert werden (Chirico *et al.*, 1988). Zudem ist in Mutanten mit Defekt in den cytosolischen Hsp70 Chaperonen Ssa1p und Ssa2p die K28-Toxinsekretion deutlich beeinträchtigt (Breinig *et al.*, 2006). Bei Ydj1p handelt es sich um ein Hsp40 Co-Chaperon, das die ATPase-Aktivität von Ssa1p stimuliert (Cyr *et al.*, 1992). Anhand von „Pulse-Chase“-

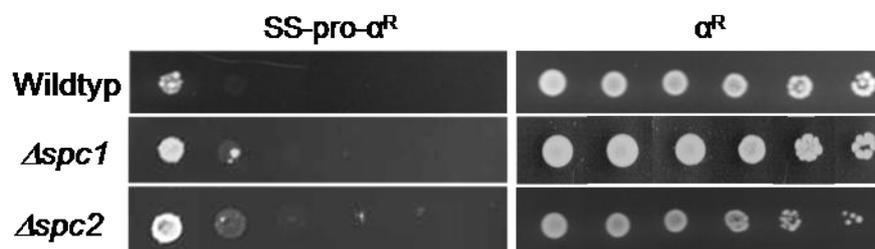
Experimenten konnte die Notwendigkeit der Ydj1p-Funktion für den (posttranslationalen) ER-Import von ppaF nachgewiesen werden (Caplan *et al.*, 1992). Ein weiteres cytosolisches Hsp40 Co-Chaperon stellt Hlj1p dar. In dieser Arbeit wurden Mutanten, bei denen die Gene *SSA1*, *SSA3*, *SSB1*, *YDJ1* oder *HLJ1* deletiert waren, auf veränderte Sensitivität gegen die intrazellulär exprimierte K28 $\alpha$ -Untereinheit untersucht, um weitere indirekte Hinweise auf den posttranslationalen ER-Import des Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  zu erhalten. Die Ergebnisse der Wachstumstests sind in Abbildung 13 dargestellt. Die beiden Deletionsmutanten  $\Delta$ *ssa1* und  $\Delta$ *ssa3* unterschieden sich kaum vom Suizid-Phänotyp des Wildtypstammes. Die Sensitivität gegenüber K28 $\alpha$  im ER war nur minimal verringert.  $\Delta$ *ssb1* und  $\Delta$ *hlj1* zeigten hingegen einen deutlicheren Phänotyp und waren in der Lage, die *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  bis zur dritten Verdünnungsstufe zu überleben. Die  $\Delta$ *ydj1*-Nullmutante verhielt sich sogar nahezu vollständig toxinresistent.



**Abbildung 13: Wachstumstest zum Nachweis einer Beteiligung cytosolischer Chaperone am ER-Import von SS-pro- $\alpha^R$ .** Hefe-Mutanten mit Deletion von Genen der SSA-Familie  $\Delta$ *ssa1*,  $\Delta$ *ssa3* sowie drei weitere cytosolische Chaperon-Mutanten ( $\Delta$ *ssb1*,  $\Delta$ *ydj1* und  $\Delta$ *hlj1*) wurden mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  und der nicht toxischen Variante  $\alpha^R$  als Negativkontrolle transformiert und das Überleben der Transformanten im Wachstumstest analysiert (Details siehe Abb. 9).

### 5.3 Einfluss des Signalpeptidase-Komplexes auf die Toxizität von K28 $\alpha$

Im ER-Lumen befindet sich ein hetero-oligomerer Signalpeptidase-Komplex (SPC), dessen katalytische Funktion die Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids neu synthetisierter Vorläuferproteine bewirkt, während oder kurz nachdem diese ins ER transloziert wurden. Bei der Hefe *S. cerevisiae* besteht dieser Komplex aus den essenziellen Untereinheiten Sec11p und Spc3p sowie den beiden nicht-katalytischen Komponenten Spc1p und Spc2p (Mullins *et al.*, 1996; YaDeau *et al.*, 1991). Da lediglich temperatursensitive Mutanten mit Defekt im *SEC11*-Gen vorlagen und diese in Wachstumstests schwierig zu handhaben sind, wurde auf die Deletionsmutanten der nicht-essenziellen Komponenten  $\Delta spc1$  und  $\Delta spc2$  zurückgegriffen. Analog zum Test der ER-Import-Mutanten wurden beide Deletionsstämme mit dem Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert, welches im Vektor pYES2.1 unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors vorlag. Die Transformanten wurden anschließend auf Selektions-Agar mit 2% Galaktose getropft, um ein Überleben der intrazellulären Expression dieser toxischen Variante nachzuweisen. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.



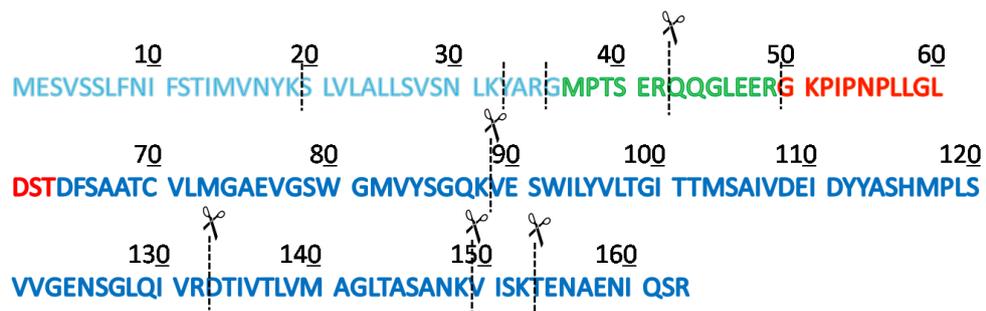
**Abbildung 14: Mutanten mit Defekt im Signalpeptidase-Komplex zeigen eine verminderte Sensitivität nach *in vivo* Expression eines K28-Letalkonstruktes.** Die Hefe-Deletionsmutanten  $\Delta spc1$  und  $\Delta spc2$  sowie der entsprechende Wildtyp BY4742 wurden mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  sowie der cytosolischen, nicht toxischen Variante  $\alpha^R$  als Negativkontrolle transformiert. Die Sensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert (Details siehe Abb. 9).

In Abwesenheit von Spc1p und Spc2p zeigten die Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber der *in vivo*-Expression des K28-Letalkonstruktes. Im Unterschied zum Wildtyp war nach Deletion von *SPC2* selbst bei der dritten Verdünnungsstufe noch schwaches Zellwachstum erkennbar, bei der  $\Delta spc1$ -Mutante hingegen war der Unterschied zum Wildtyp schwächer ausgeprägt. Mit Hilfe des „Split-mCherry“-Systems konnte zudem eine direkte Interaktion der ER-luminalen Toxinvariante SS-pro- $\alpha^R$  mit diesen beiden SPC-Untereinheiten Spc1p und Spc2p bestätigt werden (Schäuble, 2008).

#### **5.4 Trypsinverdau zum Nachweis einer möglichen Konformationsänderung der toxischen $\alpha$ -Untereinheit im Sekretionsweg**

Aufgrund der bisherigen Hinweise zum ER-Import der toxischen K28-Variante SS-pro- $\alpha^R$  sollte im Folgenden untersucht werden, ob  $\alpha$  im Sekretionsweg einer Konformationsänderung unterliegt. Diese könnte durch die Aktivität ER-luminaler Chaperone hervorgerufen werden, die an der Faltung neu synthetisierter sekretorischer Proteine beteiligt sind und diese in ihre native Konformation überführen. Zusätzlich könnten posttranslationale Modifikationen, wie O-/N-Glykosylierung oder spezifische proteolytische Spaltungen, stattfinden. Unterscheidet sich die Faltung der K28 $\alpha$ -Untereinheit nach Eintritt in den Sekretionsweg von der Konformation der cytosolischen K28 $\alpha$ -Variante, so sind in beiden Proteinvarianten theoretisch andere Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche exponiert. Entsprechend würde sich die Zugänglichkeit potenzieller Erkennungssequenzen für bestimmte Proteasen verändern. Der Aufbau des folgenden Experimentes beruhte auf der Annahme, dass bei einem Verdau beider K28 $\alpha$ -Varianten mit der Protease Trypsin über einen relativ kurzen Zeitraum nur leicht zugängliche Schnittstellen erkannt und gespalten werden, so dass im Falle einer unterschiedlichen Konformation Differenzen im

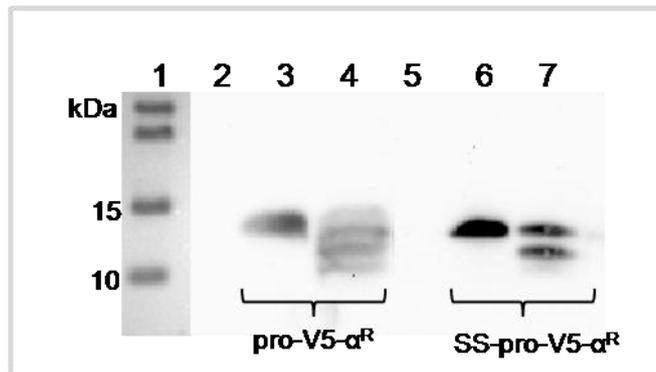
Fragmentmuster der beiden Proteinproben zu erwarten wären. Da K28 $\alpha$  selbst mittels „Pulse-Labeling“ nur als sehr schwache Bande nachgewiesen werden konnte und nach Trypsinverdau noch schwächere Signale zu erwarten waren, sollten V5-getaggte Derivate der K28 $\alpha$ -Untereinheit zum Trypsinverdau eingesetzt werden: eine cytosolische Variante V5- $\alpha^R$  sowie eine entsprechende ER-luminale Variante SS-pro-V5- $\alpha^R$  (zur Herstellung dieser Derivate siehe Punkt 5.5.2.1). Das V5-„Tag“ wurde ausgewählt, da Trypsin nicht innerhalb dieses „Tags“ schneidet, so dass die Fragmente, die durch den tryptischen Verdau entstehen, im Western Blot nachweisbar sein sollten. Die potenziellen Trypsin-Schnittstellen innerhalb von SS-pro-V5- $\alpha^R$  wurden mittels „Expasy PeptideCutter“ vorhergesagt (siehe Abbildung 15). Interessant sind speziell die Erkennungsstellen an den Aminosäure-Positionen 88, 132, 149 und 153 innerhalb der K28 $\alpha$ -Untereinheit. Zwei weitere Schnittstellen befinden sich in der pro-Region an Position 42 und 49, wobei letztere direkt vor dem V5-„Tag“ lokalisiert ist. Die ersten drei Schnittstellen liegen innerhalb der Signalsequenz und können vernachlässigt werden, da diese Region im ER durch die katalytische Aktivität des Signalpeptidase-Komplexes entfernt werden sollte.



**Abbildung 15:** Mittels „Expasy PeptideCutter“ vorhergesagte Trypsinschnittstellen innerhalb der Aminosäuresequenz von SS-pro-V5- $\alpha^R$ . Die ersten drei Schnittstellen an den Positionen 19, 32 und 35 können vernachlässigt werden, da die N-terminale Signalsequenz (hellblau dargestellt) im ER abgespalten werden sollte. Zwei weitere Erkennungssequenzen für Trypsin befinden sich innerhalb der pro-Region (grüne Buchstaben) an den Aminosäurepositionen 42 und 49. Da letztere unmittelbar vor dem V5-„Tag“ (rot markiert) schneidet, ist auch sie von geringerer Bedeutung. Wichtig sind die vier mit einer Schere gekennzeichneten Trypsin-Schnittstellen innerhalb der eigentlichen K28 $\alpha$ -Untereinheit (dunkelblau dargestellt).

Für dieses Experiment wurde die Wildtyp-Hefe BY4742 mit den oben genannten V5-getaggten K28 $\alpha$ -Derivaten transformiert. Die Zellen wurden über drei Tage in 30 ml ura d/o Medium mit 2% Galaktose angezogen, um die intrazelluläre Expression dieser unter der Transkriptionskontrolle des *GAL1*-Promotors stehenden Konstrukte zu induzieren. Der Zellaufschluss von  $4 \times 10^8$  Zellen erfolgte mit Hilfe von Glasperlen, wobei die Zellen anstelle eines Lysepuffers in McIlvaine-Puffer (pH 5,5) inkubiert wurden. Da die Proteine während der gesamten Behandlung ihre native Konformation behalten müssen, um etwaige Faltungsunterschiede nachweisen zu können, war es von größter Wichtigkeit, den Einsatz von Detergenzien oder Hitze zu vermeiden. Der leicht saure pH-Wert wurde ausgewählt, da Trypsin ein pH-Optimum im neutralen Bereich besitzt, die Aktivität von K28 oberhalb von pH 5,8 jedoch stark abnimmt (Spindler, 2004) und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass es bei einem neutralen pH zu einer Konformationsänderung von K28 $\alpha$  kommt. Die Zelltrümmer wurden durch kurze Zentrifugation des Zelllysates abgetrennt und der Überstand ü.N. mit Ethanol bei -20°C gefällt. Eine Voruntersuchung hatte ergeben, dass eine ü.N.-Inkubation von K28-Toxinkonzentrat in 90%-igem Ethanol keinen Aktivitätsverlust nach sich zieht (Ergebnis nicht dargestellt). Folglich sollte Ethanol die native Konformation der K28 $\alpha$ -Untereinheit nicht beeinträchtigen. Das gefällte Gesamtprotein wurde pelletiert und nach vollständigem Verdampfen der Ethanolreste in 500  $\mu$ l McIlvaine-Puffer (pH 5,5) resuspendiert. Mit Hilfe eines BCA-Assays wurde anschließend die Gesamtproteinkonzentration bestimmt, um das korrekte Protein:Trypsin-Verhältnis berechnen zu können, welches laut Hersteller (Fa. Promega) optimal bei 20:1 liegt. Das Ansatzvolumen wurde hierbei zwischen 20 und 100  $\mu$ l gewählt. Die Trypsin-Ansätze wurden 3 Stunden bei 37°C verdaut, anschließend 15 min bei -20°C eingefroren, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert, bevor sie zusammen mit den unbehandelten Proben in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel elektrophoretisch aufgetrennt

wurden. Die Proteine wurden schließlich auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Hilfe eines gegen das V5-„Tag“ gerichteten monoklonalen Antikörpers über Chemilumineszenz nachgewiesen. Dabei ergab sich das Problem, dass Varianten, bei denen das V5-„Tag“ N-terminal lokalisiert war, sehr schnell degradiert wurden, so dass das entsprechende K28-Konstrukt V5- $\alpha^R$  nicht im Blot nachgewiesen werden konnte (nicht dargestellt). Aus diesem Grunde wurde die cytosolische Variante pro-V5- $\alpha^R$  als Kontrolle eingesetzt. Wie aus Abbildung 16 zu entnehmen ist, führte der Trypsinverdau von pro-V5- $\alpha^R$  zur Entstehung eines relativ breiten Schmiere, aus welchem vier etwas stärker ausgeprägte Banden heraustraten. Die obere Bande lag etwa auf Höhe der unbehandelten Probe bei zirka 13 kDa, die unterste Bande bei etwa 10 kDa. Im Gegensatz dazu bewirkte der tryptische Verdau der ER-luminalen Variante SS-pro-V5- $\alpha^R$  die Entstehung von lediglich drei Banden, ein Schmier war nicht sichtbar. Auch hier befand sich die obere Bande auf Höhe der unbehandelten Probe, welche im Vergleich zur cytosolischen Variante etwas tiefer lag. Die dritte Bande zeigte sich oberhalb der 10 kDa-Bande des Standards und war sehr schwach ausgeprägt. Das entstandene Schnittmuster nach Trypsinverdau der cytosolischen Toxin-Variante unterscheidet sich klar von einer K28 $\alpha$ -Variante, die im Sekretionsweg exprimiert wurde. Das Ergebnis muss jedoch hinterfragt werden, da der Größenunterschied der beiden unbehandelten Proben auf eine Prozessierung der ER-luminalen Variante hindeutet. Später konnte gezeigt werden, dass im späten Golgi die pro-Region entfernt wird (siehe Punkt 5.5.2.3), was wiederum bedeutet, dass die cytosolische Toxinvariante eine zusätzliche Trypsinschnittstelle (in der pro-Region) enthält, die vermutlich für die Entstehung des unterschiedlichen Fragmentmusters verantwortlich ist.



**Abbildung 16: Western Blot nach Trypsinverdau V5-getaggtter K28 $\alpha$ -Varianten zum Nachweis einer möglicherweise im ER stattfindenden Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit.** Zellysate nach *in vivo* Expression der cytosolischen K28-Variante pro-V5- $\alpha^R$  sowie der ER-luminalen Variante SS-pro-V5- $\alpha^R$  in der Wildtyp-Hefe BY4742 wurden mit Trypsin über einen Zeitraum von 3 h bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde bei -20°C gestoppt und 20  $\mu$ l der Proben nach Zugabe von 10  $\mu$ l reduzierendem SDS-Probenpuffer und Denaturierung bei 95°C elektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und die V5-getaggtten Konstrukte mit anti-V5-Antikörper und sekundärem HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper über Chemilumineszenz nachgewiesen. Als Blockingpuffer diente 1x TBS mit 0,05% Tween unter Zusatz von 5% Magermilch.

#### Auftragschema:

- Spur 1: Protein-Standard (PageRuler Prestained, Fermentas)
- Spur 3: pro-V5- $\alpha^R$ , unbehandelt
- Spur 4: pro-V5- $\alpha^R$ , nach Trypsinverdau
- Spur 6: SS-pro-V5- $\alpha^R$ , unbehandelt
- Spur 7: SS-pro-V5- $\alpha^R$ , nach Trypsinverdau

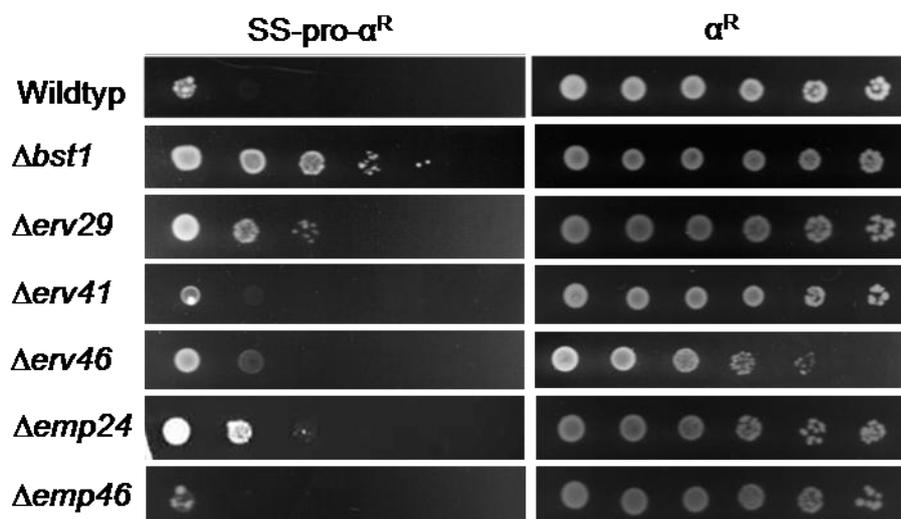
## 5.5 Untersuchungen zum Nachweis des ER-Golgi-Transportes der K28 $\alpha$ -Untereinheit

### 5.5.1 COPII-Vesikel vermitteln den Transport von K28 $\alpha$ vom ER zum Golgi-Apparat

Die Untersuchung von Deletionsmutanten mit Defekt in der Bildung von COPII-Vesikeln sollte bei der Fragestellung helfen, ob ein Weitertransport der ER-luminalen K28 $\alpha$ -Variante bis zum Golgi-Apparat erfolgt und ob eine Störung dieses Transportweges eine Auswirkung auf die Cytotoxizität von K28 $\alpha$  hat. Der Transport von luminalen oder Membranproteinen vom ER zum Golgi-Apparat wird von COPII-

bedeckten Vesikeln bewältigt, wobei eine Reihe löslicher Proteine (Sec13p/Sec31p-Komplex, Sec23p/Sec24p-Komplex und Sar1p) während des Abschnürungsprozesses für die Ausbildung der COPII-Hülle um die Vesikel verantwortlich ist (Campbell und Schekman, 1997). Die meisten *SEC*-Gene sind essenziell. Daher resultieren aus einem Gen-„Knock-out“ der essenziellen Komponenten Sec12p und Sec23p nicht lebensfähige Hefen und auch entsprechende temperatursensitive Mutanten zeigten einen starken Wachstumsdefekt. Folglich konnte nach intrazellulärer Expression eines K28-Letalkonstruktes keine Aussage über eine Beteiligung dieser Proteine getroffen werden (Ergebnis nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden Hefe-Deletionsstämme weiterer, nicht-essenzieller Komponenten getestet, die eine Rolle bei der Selektion und Verpackung von Cargomolekülen spielen, um auf diese Weise einen indirekten Hinweis auf einen ER-Golgi-Transport zu erhalten (siehe Abbildung 17). Die Deletion des Gens *EMP46*, das für eine integrale Membrankomponente von COPII-Vesikeln kodiert, zeigte im Wachstumstest einen Selbstkillerphänotyp. Auch eine  $\Delta$ *erv41*-Mutante war nicht in der Lage, die *in vivo* Expression eines K28-Letalkonstruktes zu überleben und glich phänotypisch dem Wildtyp. Erv41p liegt zusammen mit Erv46p in einem Komplex vor, dessen genaue Funktion bislang ungeklärt ist. Die Deletion eines der beiden Gene verursacht jedoch keinen generellen Transportdefekt. Über eine mögliche Funktion als Adaptoren für die Sortierung von Cargomolekülen in COPII-Vesikel wurde ebenso spekuliert, wie über eine Rolle im Golgi-ER-Recycling-Mechanismus (Otte und Barlowe, 2002). Im Wachstumstest zeigte  $\Delta$ *erv46* keinen eindeutigen Phänotyp, diese Mutante schien jedoch leicht vermindert sensitiv gegenüber der intrazellulären Expression von K28 $\alpha$  zu sein. Eindeutig waren hingegen die Phänotypen von Mutanten mit „Knock-out“ von *EMP24*, *ERV29* sowie *BST1*. Entsprechende Deletionsmutanten überlebten die intrazelluläre Expression von SS-pro- $\alpha^R$ , was auf eine stark verminderte Toxizität von K28 $\alpha$  hindeutet. Das Transmembranprotein Emp24p ist vermutlich an der Verpackung

spezifischer Cargomoleküle beteiligt (Schimmöller *et al.*, 1995, Kaiser, 2000). Munitz *et al.* (2000) beschreiben Emp24p beispielsweise als einen Adaptor/Rezeptor für den effizienten ER-Austritt des GPI-verankerten luminalen Cargoproteins Gas1p. Besonders drastisch war der Phänotyp in Abwesenheit von *BST1*. Die entsprechende Deletionsmutante verhielt sich fast vollständig resistent gegen K28 $\alpha$ . Selbst in der fünften Verdünnungsstufe war noch Zellwachstum erkennbar. Interessanterweise wird sowohl Erv29p als auch Bst1p eine Rolle bei der ER-assoziierten Degradation (ERAD) luminaler Proteine zugeschrieben (Vashist *et al.*, 2001; Caldwell *et al.*, 2001). Dieser ER-Qualitätskontroll-Mechanismus wird von einigen invasiven A/B-Toxinen, wie Ricin, ausgenutzt, um vom ER ins Cytosol zu gelangen (Simpson *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der Mutantentests lieferten somit einen ersten indirekten Hinweis, dass K28 $\alpha$  im Sekretionsweg durch COPII-Vesikel-vermittelten anterograden Transport zum Golgi-Apparat gelangt.



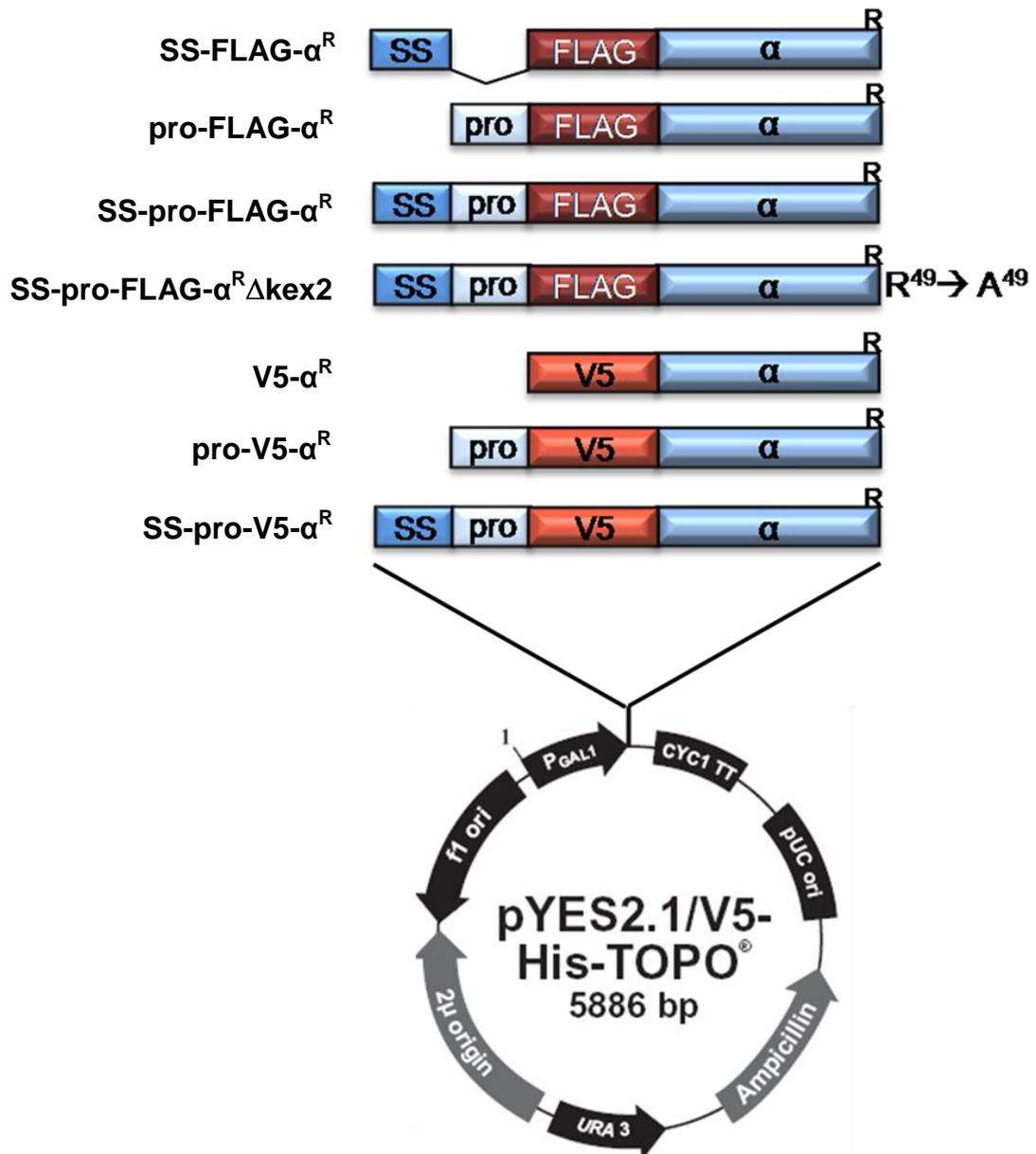
**Abbildung 17: Indirekter Nachweis des COPII-abhängigen ER-Golgi-Transports von K28 $\alpha$ .** Hefe-Deletionsmutanten mit Defekt in der COPII-Vesikelbildung und Cargoselektion wurden mit der ER-luminalen K28 $\alpha$ -Varinate SS-pro- $\alpha^R$  unter Transkriptionskontrolle des regulierbaren *GAL1*-Promotors transformiert. Die Toxinsensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert (Details siehe Abb. 9).

### 5.5.2 Untersuchungen zum Nachweis der Kex1p- und Kex2p-Prozessierung im *trans*-Golgi Kompartiment

Der Vorläufer des Killertoxins K28 wird im späten *trans*-Golgi-Kompartiment durch die Aktivität der beiden Membran-verankerten Proteasen Kex1p und Kex2p prozessiert. Beide Funktionen sind essenziell für die Reifung und Sekretion des nativen K28-Toxins. Zwar sind in einer  $\Delta kex1$ -Nullmutante weder Toxinproduktion noch –sekretion negativ beeinflusst - Eisfeld konnte in ihrer Dissertation (2001) nachweisen, dass die K28-Sekretion der Mutante um den Faktor 2 erhöht war - die biologische Aktivität des sezernierten Toxins war jedoch mindestens um 80% verringert (Schmitt und Tipper, 1995; Eisfeld, 2001). Ist hingegen das *KEX2*-Gen deletiert, ist die Sekretion des reifen Toxins vollständig inhibiert (Schmitt und Tipper, 1995). Bei Kex2p handelt es sich um eine Endoprotease, die bevorzugt C-terminal basischer Dipeptide wie Lys-Arg oder Arg-Arg spaltet (Fuller *et al.*, 1989). Im Verlauf der K28-pptox Prozessierung durch Kex2p werden die  $\gamma$ -Sequenz und die pro-Region freigesetzt (Riffer *et al.*, 2002). Die durch die Kex2p-Aktivität freigelegten endständigen basischen Aminosäuren werden schließlich von der Serin-Carboxypeptidase Kex1p entfernt (Bussey, 1988; Cooper und Bussey, 1989). Durch Toxizitätstests an entsprechenden Deletionsmutanten sollte zunächst erörtert werden, welche Rolle diese Proteasen für die Cytotoxizität der K28 $\alpha$ -Untereinheit besitzen. In einem weiteren Experiment sollte dann mit Hilfe von FLAG- und V5-getaggten K28 $\alpha$ -Derivaten eine Western-Analyse durchgeführt werden, um die Abspaltung der pro-Region nachzuweisen. Findet eine solche Prozessierung statt, wäre das ein weiterer Hinweis für den Golgi-Transport der toxischen  $\alpha$ -Untereinheit.

### 5.5.2.1 Herstellung getaggtter K28 $\alpha$ -Varianten zum Nachweis im Western Blot

Aufgrund der geringen Anzahl an Toxin-Kopien im Cytosol sensitiver Hefen erwies es sich bislang als schwierig, K28 $\alpha$ -Derivate – selbst nach intrazellulärer Expression – im Zellysate sensitiver Hefen nachzuweisen. Mit Hilfe des „Epitop-tagging“, d.h. durch Herstellung von Fusionsproteinen aus K28 $\alpha$  und einem kurzen Peptid, für welches monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen, sollte eine Signalverstärkung erreicht werden, die den Nachweis der  $\alpha$ -Untereinheit mittels Western-Analyse vereinfacht. Da zu diesem Zeitpunkt unbekannt war, welche Rolle der  $\alpha$ -C-terminale Arginin-Rest für die Toxizität spielt und da die N-terminale Signalsequenz für den ER-Import essenziell ist, wurde das „Tag“ auf DNA-Ebene unmittelbar vor die  $\alpha$ -Untereinheit fusioniert. Durch Einsatz der in Tabelle 5 (Material und Methoden) aufgeführten sequenzspezifischen (SOE) Primer wurden mittels SOE-PCR die Sequenzen für das FLAG- bzw. V5-„Tag“ in die entsprechenden Toxin-Derivate eingefügt. Als Template dienten hierbei das Plasmid pPGK-M28-I, welches den ORF des K28 $\alpha$  enthält oder entsprechende ungetaggte K28 $\alpha$ -Varianten. Die SOE-PCR erfolgte nach einem abgewandelten PCR-Programm, das unter Punkt 3.8.2 (Material und Methoden) genauer beschrieben ist. Das neun Aminosäuren lange FLAG-„Tag“ wurde ausgewählt, da ein hochspezifischer Antikörper (anti-FLAG-M1; Sigma) existiert. Dieser kann zum Nachweis einer Spaltungsreaktion dienen – vorausgesetzt durch diese Reaktion wird der N-Terminus von FLAG freigesetzt. Zusätzlich wurden Konstrukte mit dem 13 Aminosäuren umfassenden V5-„Tag“ versehen, um eine noch höhere Signalstärke im Western Blot zu erzielen. In Abbildung 18 sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten getaggtten K28 $\alpha$ -Derivate dargestellt.

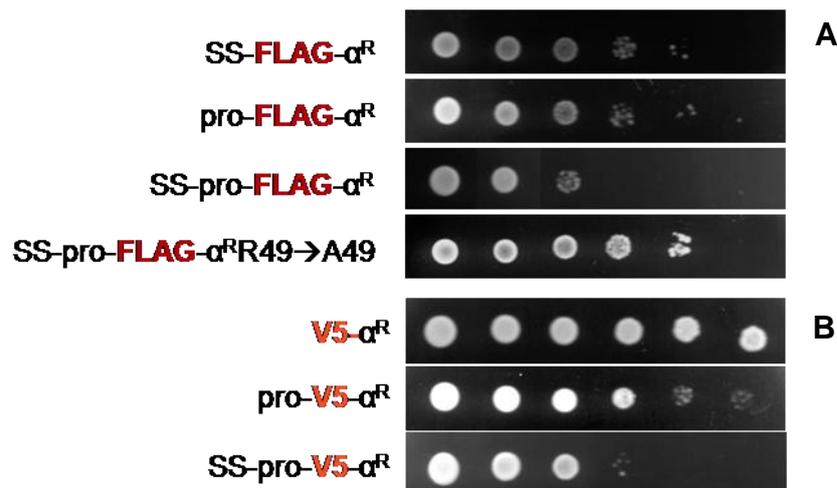


**Abbildung 18: Schematische Darstellung der hergestellten getaggten K28 $\alpha$ -Varianten zum Nachweis einer Kex2p-Prozessierung im Western Blot.** Analog zu den anfangs hergestellten Toxinkonstrukten wurden die FLAG-/V5-getaggten Varianten mit sequenzspezifischen Primern (siehe Material und Methoden, Tab. 5) mittels SOE-PCR amplifiziert und anschließend über TOPO-Klonierung in den „high copy“-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert. Da die Konstrukte unter der Transkriptionskontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors P<sub>GAL1</sub> stehen, erlaubt dieser „Shuttle“-Vektor gleichzeitig die Expression der Toxinvarianten in Hefe. Als Template diente jeweils der Vektor pPGK-M28-I, welcher für den K28 Vorläufer ptox kodiert, bzw. eine entsprechende ungetaggte Variante, wobei die Sequenz des „Tags“ jeweils über die spezifischen SOE-Primer eingebracht wurde. Bei einer luminalen FLAG-getaggten Variante wurde über ortsgerichtete Mutagenese ein Aminosäureaustausch durchgeführt, indem der Arginin-Rest an Position 49 durch Alanin ersetzt wurde. Durch diese Mutation ist die Kex2p-Erkennungsstelle zerstört und die Abspaltung der pro-Region sollte in dieser Variante blockiert sein.

Neben der cytosolischen Variante pro-FLAG- $\alpha^R$  und den beiden ER-luminalen Derivaten SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  bzw. SS-FLAG- $\alpha^R$  wurde ein weiteres Konstrukt synthetisiert, das einen Aminosäureaustausch an der Position 49 trägt. Durch diese Mutation ist die von Riffer ermittelte Kex2p-Erkennungssequenz zerstört, so dass keine Abspaltung der pro-Region mehr möglich sein sollte (Riffer *et al.*, 2002). Alle Konstrukte liegen im „Shuttle“-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> unter Transkriptionskontrolle des regulierbaren GAL1-Promotors vor. Die Richtigkeit der Insertsequenzen wurde mittels Sequenzierung überprüft.

### 5.5.2.2 Nachweis der Toxinaktivität getaggtter K28 $\alpha$ -Derivate

Da die native Proteinfunktion durch das Anfügen von „Tags“ zum Teil erheblich beeinträchtigt sein kann, sollte zunächst ein Toxizitäts-Assay der synthetisierten getaggtten K28 $\alpha$ -Varianten durchgeführt werden. Dazu wurde die sensitive Wildtyp-Hefe BY4742 mit den getaggtten Varianten transformiert und im Wachstumstest auf Toxizität untersucht (Abbildung 19). Alle Konstrukte wurden durch die anfusionsierten „Tags“ im Vergleich zu den entsprechenden ungetaggtten Varianten (siehe Abbildung 10) deutlich in ihrer Aktivität geschwächt.

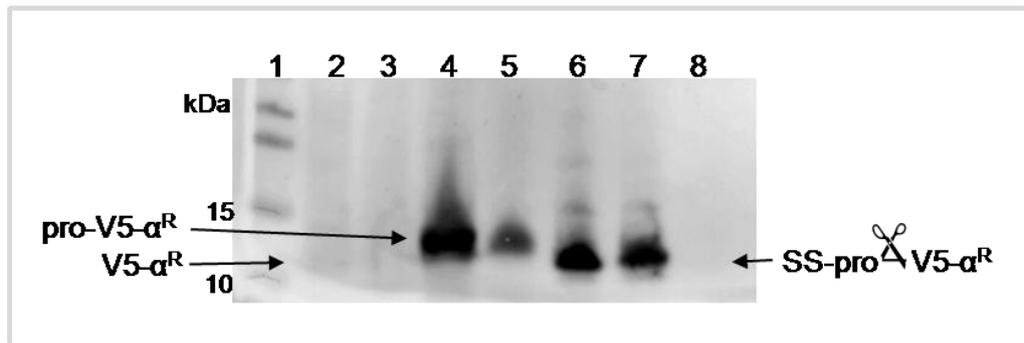


**Abbildung 19: *In vivo* Toxizitätsnachweis getaggtter K28 $\alpha$ -Derivate.** Der sensitive Wildtyp *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit den verschiedenen K28 $\alpha$ -Varianten transformiert, die unmittelbar vor der  $\alpha$ -Untereinheit ein FLAG- (A) oder V5- (B) „Tag“ tragen. Die Toxizität der K28 $\alpha$ -Derivate wurde anhand des Wachstums der Transformanten analysiert.

Lediglich die ER-luminalen Varianten mit Signalsequenz und pro-Region besaßen noch eine Restaktivität und verursachten einen Selbstkillerphänotyp. Die cytosolische V5-getaggte Form von  $\alpha^R$  zeigte überhaupt keine Toxizität, was mit früheren Ergebnissen übereinstimmte. Auffällig war, dass auch eine ER-luminale FLAG- $\alpha$ -Variante mit zerstörter Kex2p-Schnittstelle keine Toxizität mehr aufwies. Die „Tag“-Größe hatte lediglich einen minimalen Einfluss auf die verbleibende Toxizität.

### 5.5.2.3 Nachweis der Kex2p-Prozessierung mittels Western Blot Analyse

Zum Nachweis einer Kex2p-Prozessierung von SS-pro- $\alpha^R$  im späten Golgi wurden die oben aufgeführten Toxinkonstrukte mit FLAG- bzw. V5-tag mittels Lithium-Acetat-Transformation in eine sensitive Wildtyphefe eingebracht. Die *in vivo* Expression dieser K28 $\alpha$ -Derivate wurde durch Anzucht der Transformanten in *ura d/o* Medium mit 2% Galaktose über einen Zeitraum von drei Tagen induziert.  $5 \times 10^8$  Zellen wurden geerntet und mittels S80-Schnellaufschluss oder alternativ mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Nach dem Glasperlenaufschluss wurde der Überstand zudem einer Ethanol-fällung unterzogen. Die Proben wurden anschließend mit 2x reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und nach einem fünf-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und durch den Einsatz primärer Antikörper, die gegen FLAG oder V5 gerichtet waren, nachgewiesen. Die Visualisierung erfolgte entweder colorimetrisch über AP-gekoppelte sekundäre Antikörper oder durch Einsatz HRP-gekoppelter Antikörper mittels Chemilumineszenz, was einen wesentlich sensitiveren Nachweis erlaubte.



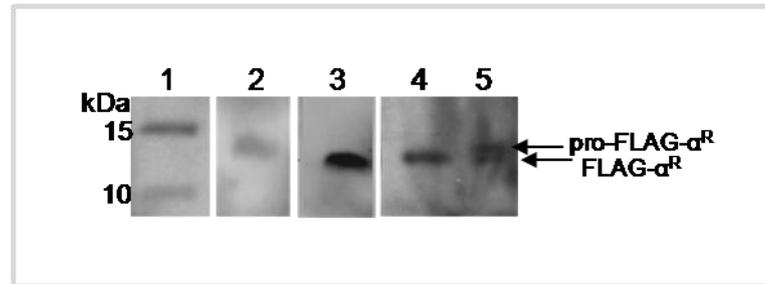
**Abbildung 20: Western-Analyse zum Nachweis der Kex2p-Prozessierung V5-getaggtter K28 $\alpha$ -Varianten im späten Golgi.** Sowohl die cytosolischen V5-getaggtten K28 $\alpha$ -Konstrukte V5- $\alpha^R$  und pro-V5- $\alpha^R$  als auch ein ER-luminales Derivat, SS-pro-V5- $\alpha^R$ , wurden in die sensitive Hefe BY4742 transformiert. Die Transformanten wurden in Medium mit 2% Galaktose angezogen, um die *in vivo* Expression der Toxinderivate anzuschalten, die sich unter Transkriptionskontrolle des *GAL1*-Promotors befanden. Nach dreitägiger Inkubation wurden  $5 \times 10^8$  Zellen aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden mit 2x reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit anti-V5- und AP-gekoppeltem anti-„mouse“-Antikörper durch Umsetzung des chromogenen Substrates NBT/BCIP (1:500 in 10 ml Färbepuffer).

#### Auftragschema:

- Spur 1: Protein-Standard (PageRuler Prestained, Fermentas)
- Spur 2: pYES2.1/V5- $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l
- Spur 3: pYES2.1/V5- $\alpha^R$ , 20  $\mu$ l
- Spur 4: pYES2.1/pro-V5 $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l
- Spur 5: pYES2.1/pro-V5 $\alpha^R$ , 20  $\mu$ l
- Spur 6: pYES2.1/SS-pro-V5 $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l
- Spur 7: pYES2.1/SS-pro-V5 $\alpha^R$ , 20  $\mu$ l
- Spur 8: pYES2.1-Leervektor

Im Western Blot der V5-getaggtten K28- $\alpha$ -Konstrukte (siehe Abbildung 20) zeigte sich ein deutlicher Größenunterschied zwischen der im Cytosol exprimierten Variante pro-V5- $\alpha^R$  (Spuren 4 und 5) und dem Konstrukt mit N-terminaler Signalsequenz (Spuren 6 und 7). Letzteres sollte nach Eintritt in das ER-Lumen und Entfernung des Sekretionssignals durch den Signalpeptidasekomplex eine Größe von etwa 13 kDa aufweisen und damit in etwa auf der Höhe von pro-V5- $\alpha^R$  laufen. Stattdessen ließ sich jedoch eine kleinere Bande etwas oberhalb von 11 kDa erkennen. Dieser Größenunterschied ist womöglich auf die Abspaltung der 13 Aminosäuren umfassenden pro-Region durch die Wirkung der Kex2p-Endopeptidase in einem späten

Golgi-Kompartiment zurückzuführen. In der Spur der V5- $\alpha^R$ -Probe konnte eine kaum wahrnehmbare Bande beobachtet werden, welche ebenfalls etwas oberhalb von 11 kDa zu liegen schien. Wie sich später herausstellte, werden Konstrukte, bei denen das V5-„Tag“ am N-Terminus lokalisiert ist, recht schnell degradiert, was zu Nachweisschwierigkeiten im Western Blot führt (dies betraf jedoch nicht die ER-luminalen Konstrukte nach Abspaltung der pro-Region). Parallel zu den V5-getaggten Toxinvarianten wurden auch Hefe-Zellysate nach *in vivo* Expression verschiedener K28- $\alpha$ -Derivate mit FLAG-„Tag“ im Western Blot analysiert. Die Detektion der Banden erfolgte hier mit anti-FLAG-M2-Antikörper und einem HRP-gekoppelten anti-„mouse“-Antikörper. Da die Signalstärke mit anti-FLAG-Antikörper wesentlich schwächer war als mit anti-V5-Antikörper, wurden die Banden mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Auch hier zeigten sich deutliche Größenunterschiede der einzelnen K28-Banden (Abbildung 21). Nach cytosolischer Expression trat eine Bande bei etwa 13 kDa auf. Dieses Ergebnis deckte sich, ebenso wie die Bande der ER-luminalen Variante SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  (Spur 4), mit den Ergebnissen aus Abbildung 20. Ebenso befand sich die ER-luminale Variante ohne pro-Region auf gleicher Höhe wie die entsprechende Probe mit pro-Region, was vermutlich auf die Abspaltung der pro-Region zurückzuführen ist. Interessanterweise existierten in Spur 5 nach Zerstörung der Kex2p-Schnittstelle durch einen Aminosäure-Austausch an Position 49 (Arg $\rightarrow$ Ala) zwei Banden, von denen die obere der Größe der unprozessierten Form nach Abspaltung des Signalpeptids entsprach. Die kleinere Bande lief mit ungefähr 11 kDa auf Höhe der vollständig prozessierten Variante von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ .

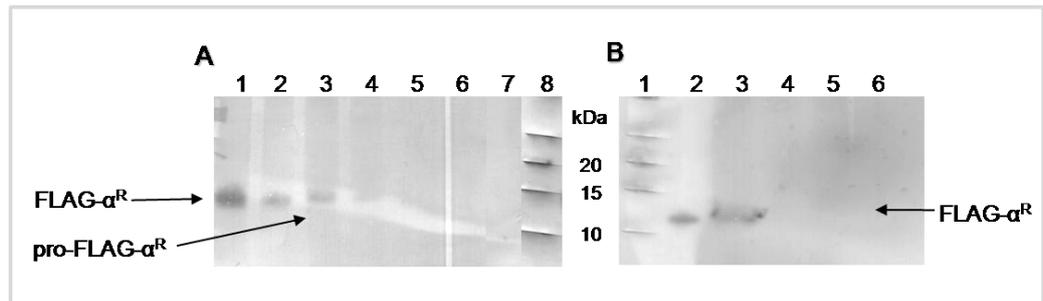


**Abbildung 21: Western Blot zum Nachweis der Kex2p-Prozessierung von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  durch Größenunterschied der FLAG-getaggte K28 $\alpha$ -Variante nach Eintritt in den Sekretionsweg.** Verschiedene FLAG-getaggte K28- $\alpha$ -Derivate wurden in die sensitive Hefe BY4742 transformiert und nach Anzucht der Transformanten in Selektionsmedium mit 2% Galaktose intrazellulär exprimiert.  $5 \times 10^8$  Zellen wurden mittels Glasperlen aufgeschlossen, die Zelldebris abgetrennt, die Ansätze anschließend mit reduzierendem 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf ein 10%-iges Tris/Tricin-Gel aufgetragen und dann geblottet. Die Detektion erfolgte mit anti-FLAG-M2- (1:5000) und HRP-gekoppeltem anti-„mouse“-Antikörper (1:40.000) mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm.

#### Auftragschema:

- Spur 1: Protein-Standard (PageRuler Prestained, Fermentas)
- Spur 2: Zellaufschluss von pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l
- Spur 3: Zellaufschluss von SS-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l
- Spur 4: Zellaufschluss von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l
- Spur 5: Zellaufschluss von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  R<sup>49</sup>→A<sup>49</sup>, 30  $\mu$ l

Um einen klaren Beweis für die Abspaltung der pro-Region zu erhalten, wurden Zelllysate und Kulturüberstand nach intrazellulärer Expression von pro-FLAG- $\alpha^R$  sowie einer entsprechenden Variante mit Signalsequenz im Western Blot durch Einsatz des hochspezifischen anti-FLAG-M1-Antikörpers detektiert, der selektiv den N-Terminus des FLAG-„Tag“ erkennt. Dabei darf das „Tag“ weder inmitten eines Fusionsproteins liegen, noch durch die Start-Aminosäure Methionin blockiert sein. Demzufolge bindet der Antikörper das „Tag“ erst nach Abspaltung von Aminosäureresten, die N-terminal an das „Tag“ grenzen. Im Fall von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  liegt die pro-Region unmittelbar N-terminal vor FLAG. Sollte also tatsächlich im späten Golgi eine Prozessierung durch Kex2p erfolgen und die pro-Region entfernt werden, würde erst hierdurch die Zugänglichkeit des Antikörpers zum FLAG-„Tag“ ermöglicht.



**Abbildung 22: Western Blot zum Nachweis der Prozessierung der pro-Region durch Kex2p-Spaltung im späten Golgi.** Zelllysate von pro-V5- $\alpha^R$  sowie SS-pro-V5- $\alpha^R$  wurden mittels S80-Schnellaufschluss vorbereitet, parallel in zwei 10%-igen Tris/Tricin-Gelen aufgetrennt und geblottet. In Gel A wurden zusätzlich  $\ddot{u}$ .N. mit EtOH gefällte Kulturüberstände der zum Zellaufschluss geernteten Zellen aufgetragen, um die Sekretion der K28 $\alpha$ -Konstrukte nachzuweisen. Die Detektion erfolgte colorimetrisch mit anti-FLAG-M2- (Blot A) oder anti-FLAG-M1-Antikörper (Blockingpuffer mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; Blot B) sowie AP-gekoppeltem anti-„mouse“-Antikörper.

#### Auftragschema Blot A: anti-FLAG-M2

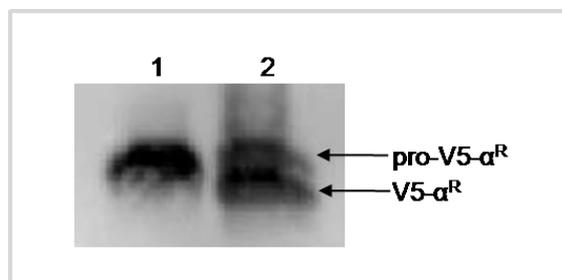
Spur 1: S80 von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 2: S80 von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ , 20  $\mu\text{l}$   
 Spur 3: S80 von pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 4: S80 von pro-FLAG- $\alpha^R$ , 20  $\mu\text{l}$   
 Spur 5: EtOH-gefällter  $\ddot{U}$ S von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 6: EtOH-gefällter  $\ddot{U}$ S von pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 7: S80 von pYES2.1-Leervektor, 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 8: Protein-Standard (PageRuler Prestained; Fermentas)

#### Auftragschema Blot B: anti-FLAG-M1

Spur 1: S80 von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ , 20  $\mu\text{l}$   
 Spur 2: S80 von SS-pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 3: S80 von pro-FLAG- $\alpha^R$ , 20  $\mu\text{l}$   
 Spur 4: S80 von pro-FLAG- $\alpha^R$ , 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 5: S80 von pYES2.1-Leervektor, 30  $\mu\text{l}$   
 Spur 6: Protein-Standard (PageRuler Prestained; Fermentas)

Aufgetragen wurden die Proben SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  (vgl. Abbildung 22 A und B, Spuren 1 und 2) sowie eine Variante ohne SS (Spuren 3 und 4). Blot A wurde mit dem Standard-Antikörper (M2) entwickelt, wohingegen dieselben Proben in Blot B mit anti-FLAG-M1 nachgewiesen wurden. Wie zuvor schon in Abbildung 21 gezeigt, wies das ER-luminale Konstrukt im Vergleich zu der cytosolisch exprimierten K28 $\alpha$ -Variante eine geringere Größe auf (Abbildung 22 A). Zusätzlich wurde im Blot A

in den Spuren 5 und 6 EtOH-gefällter zellfreier Kulturüberstand aufgetragen, um eine mögliche Sekretion der Toxinkonstrukte nachzuweisen. In diesen Spuren war jedoch, ebenso wie in der Vektorkontrolle, keine Bande detektierbar. In Blot B wurden nur die Zellysate untersucht. De facto ließ sich K28- $\alpha$  nur in den Proben mit Sekretionssignal (B, Spuren 1 und 2) nachweisen, nicht aber in der Probe der cytosolischen Variante. Dieses Ergebnis deutet auf eine Abspaltung der pro-Region hin, was gleichzeitig impliziert, dass K28- $\alpha$  nach Eintritt in den Sekretionsweg ein spätes *trans*-Golgi-Kompartiment erreicht. Nach intrazellulärer Expression einer V5-getaggten K28 $\alpha$ -Variante mit SS in einer Mutante mit Defekt in der Kex2p-Prozessierung ergaben sich im Western Blot zwei Banden (siehe Abbildung 23). Die größere Bande befand sich auf der Höhe des cytosolischen Konstruktes pro-V5- $\alpha^R$ , während die zweite, kleinere Bande etwas oberhalb von 11 kDa lag. In Abwesenheit der Endopeptidase Kex2p wird demnach nur noch ein Teil des K28 $\alpha$ -Derivates prozessiert.



**Abbildung 23: Western Blot zum Nachweis fehlender Kex2p-Prozessierung nach Expression von SS-pro-V5- $\alpha^R$  in einer  $\Delta kex2$ -Mutante.** Das V5-getaggte K28 $\alpha$ -Derivat SS-pro-V5- $\alpha^R$  wurde in die  $\Delta kex2$ -Mutante und das cytosolische Derivat pro-V5- $\alpha^R$  in den isogenen Wildtyp BY4742 transformiert und nach Anzucht der Transformanten in *ura* d/o Galaktose intrazellulär exprimiert.  $5 \times 10^8$  Zellen wurden mittels Glasperlen aufgeschlossen, die Zelldebris abgetrennt, die Ansätze anschließend mit reduzierendem 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf ein 10%-iges Tris/Tricin-Gel aufgetragen und geblottet. Die Detektion erfolgte mit anti-V5- (1:1000) und HRP-gekoppeltem anti-„mouse“-Antikörper (1:40.000) mittels Chemilumineszenz.

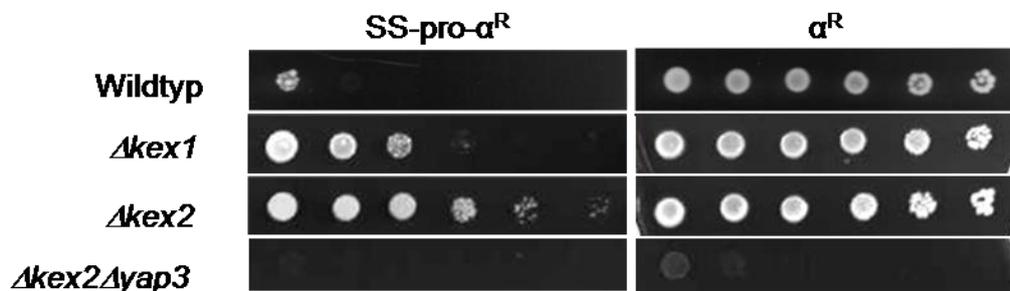
#### Auftragschema:

Spur 1: Zellaufschluss von BY4742/pro-V5- $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l

Spur 2: Zellaufschluss von  $\Delta kex2$ /SS-pro-V5- $\alpha^R$ , 30  $\mu$ l

#### 5.5.2.4 Bedeutung einer Kex1p/Kex2p-Prozessierung von K28 $\alpha$ für dessen *in vivo* Toxizität

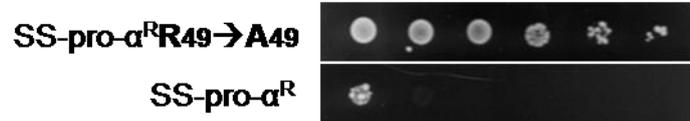
In einem weiteren Toxizitäts-Assay wurde analysiert, ob die Funktionen der Kex1p- und Kex2p-Proteasen für die *in vivo*-Toxizität von K28- $\alpha$  von Bedeutung sind. Wie aus Abbildung 24 zu entnehmen ist, führt die Abwesenheit beider Gene tatsächlich zu einer deutlich verringerten Toxizität der intrazellulär exprimierten K28 $\alpha$ -Varianten. Sowohl  $\Delta kex1$  als auch  $\Delta kex2$  Mutanten überlebten die Expression des Letalkonstruktes. Während  $\Delta kex1$  bis zur vierten Verdünnungsstufe wuchs, verursachte eine *KEX2*-Deletion eine nahezu vollständige Resistenz. Zusätzlich wurde eine Mutante mit einem *KEX2/YAP3* Doppel-„Knock-out“ getestet, da Yap3p eine zu Kex2p redundante Funktion besitzt (Egel-Mitani *et al.*, 1990). Diese wies jedoch selbst nach Transformation des Kontrollkonstruktes einen starken Wachstumsdefekt auf, so dass eine Interpretation nicht möglich war.



**Abbildung 24: Wachstumstest zum Nachweis der Bedeutung der Endopeptidase Kex2p und Carboxypeptidase Kex1p für die K28 $\alpha$  Toxizität.** Hefemutanten mit Deletion der Gene *KEX1* und *KEX2*, welche für Proteasen kodieren, die eine wichtige Rolle bei der K28-pptox-Prozessierung spielen, wurden mit dem K28 $\alpha$ -Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach Anzucht der Transformanten wurde die Toxizität dieses Konstruktes durch Wachstum der einzelnen Transformanten analysiert.

Ein noch deutlicherer Phänotyp konnte durch Mutation der Kex2p-Erkennungsstelle am C-Terminus der pro-Region erzielt werden. Nach Austausch des Arginin-Restes an Position 49 durch Alanin sollte die pro-Region als Folge nicht mehr durch die Funktion von Kex2p entfernt

werden können (Riffer *et al.*, 2002). Tatsächlich wurde im Wachstumstest einer sensitiven Hefe, die diese mutierte K28 $\alpha$ -Variante exprimierte, eine vollständige Resistenz nachgewiesen (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Nach Zerstörung der Kex2p-Schnittstelle innerhalb der pro-Region kommt es zum vollständigen Verlust der *in vivo* Toxizität von K28- $\alpha$ .** Die von Riffer (2002) beschriebene Kex2p-Erkennungsstelle, die während der K28-pptox-Prozessierung zur Abspaltung der pro-Region führt, wurde innerhalb der toxischen, ER-luminalen Variante SS-pro- $\alpha^R$  durch einen Aminosäure-Austausch an der Position 49 (R $\rightarrow$ A) zerstört.

#### 5.5.2.5 Untersuchungen zur Rolle des $\alpha$ -C-terminalen Arginin-Restes für Kex1p-Prozessierung und *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$

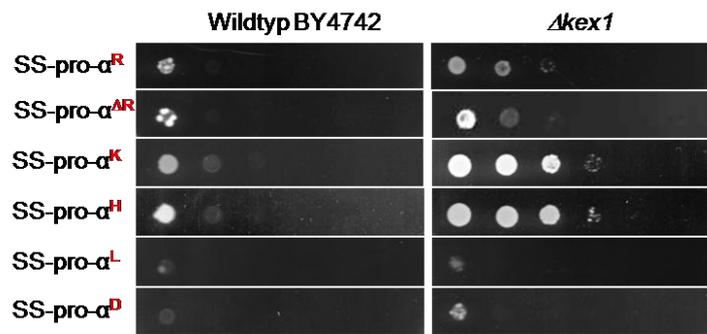
Die  $\alpha$ -Untereinheit von K28 besitzt am C-Terminus ein Arginin als potenzielle Kex1p-Schnittstelle, welches im natürlichen Toxinvorläufer erst durch Kex2p-Prozessierung freigelegt wird (Riffer *et al.*, 2002). In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten diejenigen K28 $\alpha$ -Derivate die größte Toxizität, die N-terminal mit einer Signalsequenz (SS) oder einem Kernlokalisierungssignal (NLS) ausgestattet waren und zusätzlich noch ein  $\alpha$ -C-terminales Arginin trugen (Sendzig, 2003; Reiter, 2004). Es wurde vermutet, dass der Arginin-Rest das Toxin zusätzlich stabilisiert und möglicherweise ein längeres Verweilen im ER bewirkt. Um nun den Einfluss des  $\alpha$ -C-terminalen Arginins auf die *in vivo* Toxizität näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene K28 $\alpha$ -Derivate hergestellt, in denen dieser Rest entweder deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt wurde. Die Herstellung erfolgte analog zu den oben aufgeführten Toxin-Derivaten mittels PCR, wobei die C-terminalen Reste über die Primer 19-22 eingeführt wurden und das Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  als Template diente. Die betreffenden Konstrukte wurden in den Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> hinter den

*GAL1*-Promotor kloniert und sequenziert. Die hergestellten Derivate sind in Abbildung 26 schematisch dargestellt. Neben dem isogenen Wildtyp-Stamm BY4742 wurde die Deletionsmutante  $\Delta kex1$  mit den Konstrukten transformiert, um den Einfluss der Carboxypeptidase-Funktion von Kex1p auf die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$  zu bestimmen.

	pl
SS pro $\alpha$	4,666
SS pro $\alpha$ R	4,837
SS pro $\alpha$ K	4,837
SS pro $\alpha$ H	4,830
SS pro $\alpha$ L	4,666
SS pro $\alpha$ D	4,538

**Abbildung 26: Schematische Darstellung der hergestellten K28- $\alpha$ -Derivate nach Deletion oder Substitution des  $\alpha$ -C-terminalen Arginins.** Im nativen K28-pptox befindet sich als potenzielle Kex1p-Schnittstelle am  $\alpha$ -C-Terminus ein basischer Arginin-Rest. Zur Untersuchung der Bedeutung dieses Restes für eine Kex1p-Prozessierung im späten Golgi und/oder die Toxizität von K28- $\alpha$  wurde diese positiv geladene Aminosäure Arginin entweder deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt. Eine Substitution erfolgte einerseits durch die basischen Aminosäuren Lysin oder Histidin. Darüberhinaus wurde der Effekt eines hydrophoben (Leucin) bzw. eines sauren Restes (Asparaginsäure) auf die Toxizität von K28- $\alpha$  untersucht. Rechts neben der Abbildung sind in Tabellenform die pI-Werte der jeweiligen  $\alpha$ -Derivate aufgeführt.

Die Toxizität aller K28 $\alpha$ -Varianten wurde vergleichend gegen den sensitiven Wildtyp sowie eine  $\Delta kex1$ -Mutante getestet (Abbildung 27). Das Konstrukt SS-pro- $\alpha$ , dem das C-terminale Arginin fehlte zeigte entgegen früheren Beobachtungen keinen Toxizitätsverlust und bewirkte denselben Suizid-Phänotyp wie das Letalkonstrukt mit Arginin. Die Substitution des  $\alpha$ -C-terminalen Arginin-Restes durch Leucin oder Aspartat verursachte einen toxischen Phänotyp, der nicht nur dem des ursprünglichen Derivates gleich, sondern im direkten Vergleich noch stärker ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu führte eine Substitution durch die ebenfalls basische Aminosäure Lysin ebenso wie der Austausch durch Histidin nur zu einem unwesentlichen Toxizitätsverlust.



**Abbildung 27: Toxizitätstest verschiedener K28 $\alpha$ -Derivate nach Deletion oder Substitution des  $\alpha$ -C-terminalen Arginins in der sensitiven Wildtyp-Hefe BY4742 und einer  $\Delta kex1$ -Mutante.** Die in Abbildung 26 schematisch abgebildeten K28 $\alpha$ -Varianten wurden in die Wildtyp-Hefe *S. cerevisiae* BY4742 und eine  $\Delta kex1$ -Deletionsmutante transformiert. Der Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf die Toxizität des K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes wurde im Wachstumstest analysiert.

Ein Vergleich der Toxizität der getesteten K28 $\alpha$ -Varianten in einer  $\Delta kex1$ -Nullmutante ergab, dass die Toxizität von Derivaten mit Leucin und Aspartat erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt wurde, da beide Reste nicht von der Carboxypeptidase erkannt und gespalten werden. Wie zuvor bereits getestet, führte hingegen die *in vivo* Expression von SS-pro- $\alpha^R$  in der  $\Delta kex1$  zu einer verminderten Sensitivität der Mutante. Die Toxinaktivität der Arginin-freien Variante war in Abwesenheit von Kex1p nur leicht vermindert, wohingegen beide Derivate mit Lysin als auch mit Histidin ihre Toxizität fast vollständig verloren hatten.

## 6 Betrachtung der K28 $\alpha$ -Retrotranslokation

### 6.1 Untersuchungen zum Rücktransport von K28 $\alpha$ vom späten *trans*-Golgi zum ER

#### 6.1.1 Phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit Defekten in der COPI-Vesikelbildung

Vesikel, die den retrograden Transport vom Golgi zum ER vermitteln, werden bei ihrer Abschnürung von einem heptameren Protein-Komplex umhüllt, welcher COPI genannt wird (Waters *et al.*, 1991; Stenbeck *et al.*, 1993; Barlowe, 2000). Diese COPI Hülle wird von dem sogenannten „Coatomer“ gebildet, einem etwa 800 kDa großen Proteinkomplex, der sich bei *S. cerevisiae* aus den Untereinheiten Ret1p (=Cop1p), Sec26p, Sec27p, Sec21p, Ret2p, Sec28p und Ret3p zusammensetzt. Überdies erfordert die Hüllbildung die Funktion einer kleinen GTPase (Arf1p oder Arf2p). In dieser Arbeit wurden Mutanten mit einem Defekt in einer der nicht-essenziellen Untereinheiten des COPI „Coatomers“ auf Veränderungen in ihrer Sensitivität gegen das K28-Letalkonstrukt untersucht. Die beiden Mutanten  $\Delta ret2$  und  $\Delta ds11$  lagen als diploide Hefen vor, die jeweils ein intaktes Allel dieser Gene trugen, wohingegen die zweite Gen-Kopie deletiert war. Der isogene Wildtyp zu diesen Mutanten ist der Stamm BY4743. Wie den Ergebnissen der *in vivo* Wachstumstests in Abbildung 28 zu entnehmen ist, zeigten weder  $\Delta ret2$  oder  $\Delta ds11$  noch  $\Delta sec28$  und  $\Delta rer1$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Sensitivität nach Expression des K28-Letalkonstruktes. Demzufolge konnte keine Beteiligung von COPI Vesikeln am retrograden Golgi-ER-Transport nachgewiesen werden. Um einen retrograden Transport über COPI-Vesikel ausschließen zu können, müssten weitere Komponenten des „Coatomers“ getestet werden. Überdies wurden bereits alternative Wege beschrieben, über die Proteine COPI-unabhängig vom Golgi zum ER transportiert werden

können. Beispielsweise erfolgt der retrograde Transport der Shiga Toxin B-Kette in Abhängigkeit der kleinen GTPase Rab6, aber unabhängig von COPI (Girod *et al.*, 1999).

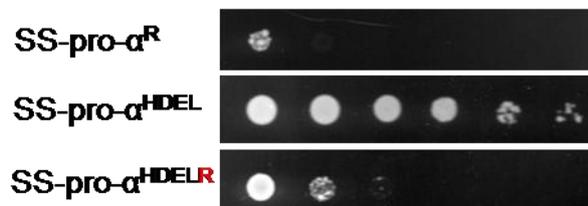


**Abbildung 28: Wachstumstest von Mutanten mit Defekt in nicht-essenziellen Komponenten des COPI-„Coatomers“ zur Untersuchung des retrograden Transports von K28 $\alpha$ .**  $\Delta sec28$ - bzw.  $\Delta rer1$ -Nullmutanten sowie heterozygot diploide  $\Delta ret2/RET2$  bzw.  $\Delta dsl1/DSL1$ -Mutanten wurden mit dem K28 $\alpha$ -Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des K28 $\alpha$ -Derivates wurde die Toxinsensitivität der Mutanten mit der des betreffenden Wildtypes verglichen.

### 6.1.2 Einfluss eines C-terminalen ER-Retentionssignals auf die Toxizität von K28 $\alpha$

In einem weiteren Experiment sollte die Frage adressiert werden, ob die Toxizität von K28 $\alpha$  durch Anheften eines ER-Retentionssignals gesteigert werden kann. Zellfraktionierungsstudien von Hefe zeigten, dass Fusionsproteine aus pro- $\alpha$ -Faktor oder Invertase mit C-terminalem HDEL-Motiv zwar im ER lokalisiert, aber dennoch durch Anheftung  $\alpha$ -1,6-verknüpfter Mannosereste modifiziert waren (Dean und Pelham, 1990). Eine solche Modifikation erfolgt stets im Golgi. Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass ER-Proteine in den Golgi-Apparat gelangen, wo sie Golgi-spezifischen Modifikationen unterliegen, und anschließend zum ER zurücktransportiert werden. Die Identifizierung des HDEL-Rezeptors Erd2p lieferte 1990 den nötigen Beweis für die Existenz eines solchen Rezeptor-vermittelten Retentionsmechanismus, der luminaire ER-Proteine mit HDEL-Motiv, zu denen auch Kar2p und Pdi1p zählen, an ihrer Sekretion hindert (Semenza *et al.*, 1990). Eine Möglichkeit, den retrograden Transport von K28 $\alpha$  vom Golgi zum ER nachzuweisen, bestand darin, das Tetrapeptid HDEL, das normalerweise am C-Terminus der

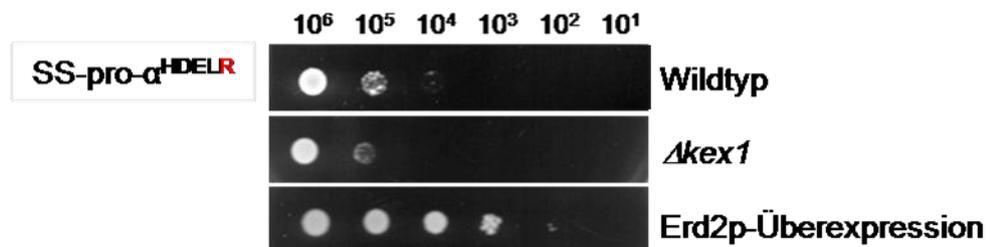
$\beta$ -Untereinheit den retrograden Transport des nativen K28-Toxins in der Zielzelle steuert, an den C-Terminus der K28 $\alpha$ -Untereinheit zu fusionieren. Diese Fusion sollte einen effektiveren Rücktransport des Toxins ins ER bewirken. Als Folge der erhöhten K28 $\alpha$ -Konzentration im ER sollte die ER-Export-Rate erhöht sein, was schließlich in einer erhöhten Toxizität von K28 $\alpha$  resultieren würde. Mittels PCR wurden unter Zuhilfenahme der 3'-Primer 17 und 18 ausgehend von SS-pro- $\alpha^R$  als „Template“ zwei weitere Toxin-Derivate erzeugt, die C-terminal das ER-Retentionssignal HDEL tragen. In einer Variante wurde dieses Motiv durch ein zusätzliches Arginin C-terminal maskiert, so dass keine Erkennung durch den HDEL-Rezeptor Erd2p im Golgi erfolgen kann. Die intrazelluläre Expression des K28 $\alpha$ -Konstruktes SS-pro- $\alpha^{HDEL}$  im ER der sensitiven Hefe BY4742 führte im Wachstumstest (vgl. Abbildung 29) entgegen aller Erwartung zur vollständigen Resistenz der produzierenden Hefe. Das Kontrollkonstrukt mit maskiertem Retentionssignal hingegen zeigte nach *in vivo* Expression eine deutliche Toxizität, die im Vergleich zum Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  nur minimal reduziert war.



**Abbildung 29: Toxizitätstest zweier K28 $\alpha$ -Derivate mit C-terminalem ER-Retentionssignal HDEL(R).** Zwei modifizierte K28 $\alpha$ -Derivate, die C-terminal das ER-Retentionssignal HDEL tragen, welches in einer Variante durch ein Arginin maskiert ist, wurden in die Wildtyp-Hefe *S. cerevisiae* BY4742 transformiert. Die Transformanten wurden im Wachstumstest analysiert, um Hinweise auf die Toxizität dieser K28 $\alpha$ -Derivate zu erhalten.

Ein effizienter Rücktransport der K28 $\alpha$ -Untereinheit zum ER führte somit zu einer verminderten Toxinaktivität. Gelangten allerdings nur wenige K28 $\alpha$ -Moleküle zurück zum ER, wie es nach Anfügen des C-terminalen Arginins an HDEL der Fall sein sollte, bildete sich ein Selbstkillerphänotyp aus.

Mit Hilfe eines weiteren Experimentes sollten obige Ergebnisse überprüft werden. Dazu wurde das K28 $\alpha$ -Derivat mit maskiertem ER-Retentionssignal zum einen in eine  $\Delta kex1$ -Mutante transformiert, so dass der endständige Arginin-Rest nicht entfernt werden kann und die Erkennung durch den HDEL-Rezeptor Erd2p blockiert bleibt. Durch Überexpression von Erd2p sollten hingegen mehr HDEL-Rezeptoren in der Zelle vorliegen, was die Transporteffizienz von SS-pro- $\alpha^{\text{HDELR}}$  zum ER im Vergleich zum Wildtyp steigern sollte. War die Prozessierung des maskierenden Arginins durch Expression von SS-pro- $\alpha^{\text{HDELR}}$  in einer  $\Delta kex1$ -Deletionsmutante vollständig blockiert, bildete sich kein stärkerer Selbstkillerphänotyp aus (vgl. Abbildung 30).



**Abbildung 30: Toxizitätstest einer K28 $\alpha$ -Variante mit maskiertem ER-Retentionssignal in verschiedenen Mutanten zur Untersuchung des Golgi-ER-Transportes von K28 $\alpha$ .** Das K28 $\alpha$ -Derivat mit maskiertem ER-Retentionssignal HDELR am C-Terminus der K28 $\alpha$ -Untereinheit wurde in eine  $\Delta kex1$ -Deletionsmutante und in einen Wildtyp-Stamm, in dem das *ERD2*-Gen unter Transkriptionskontrolle des *GAL1*-Promotors vorlag, transformiert. Von jeder Transformante wurden in drei parallelen Ansätzen Verdünnungsreihen (1:10) hergestellt und jeweils 5  $\mu$ l jeder Verdünnung auf ura d/o Galaktose getropft. Nach Induktion der intrazellulären Expression wurden die Zellen 5 Tage bei 30°C bebrütet und anschließend das Wachstum der einzelnen Transformanten mit dem Wachstum des Wildtyps verglichen.

Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung tatsächlich auf einer fehlenden ER-Retention beruht, wurde der Einfluss der HDEL-Rezeptor-Konzentration auf die Cytotoxizität entsprechender K28 $\alpha$ -Derivate untersucht. Da zu diesem Zeitpunkt keine *ERD2*-Deletionsmutante ohne Wachstumsdefekt verfügbar war, wurde eine myc-getaggte Erd2p-Variante unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors im ER des sensitiven Wildtyps BY4742 überexprimiert. Da das *ERD2*-Gen ebenfalls im „Shuttle“-Vektor pYES2.1 vorlag, musste das K28 $\alpha$ -

Konstrukt mit HDEL<sub>R</sub> in den Expressionsvektor YEp351 umkloniert werden, in dem K28 $\alpha$  ebenfalls unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors steht. Dieser Vektor erlaubte die Selektion in Leucin-freiem Kulturmedium. Eine 1000-fach gesteigerte Transkriptionsrate von *ERD2* führte bei gleichzeitiger Expression des Konstruktes SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL}_R}$  zu einem fast vollständigen Verlust der K28-Toxizität.

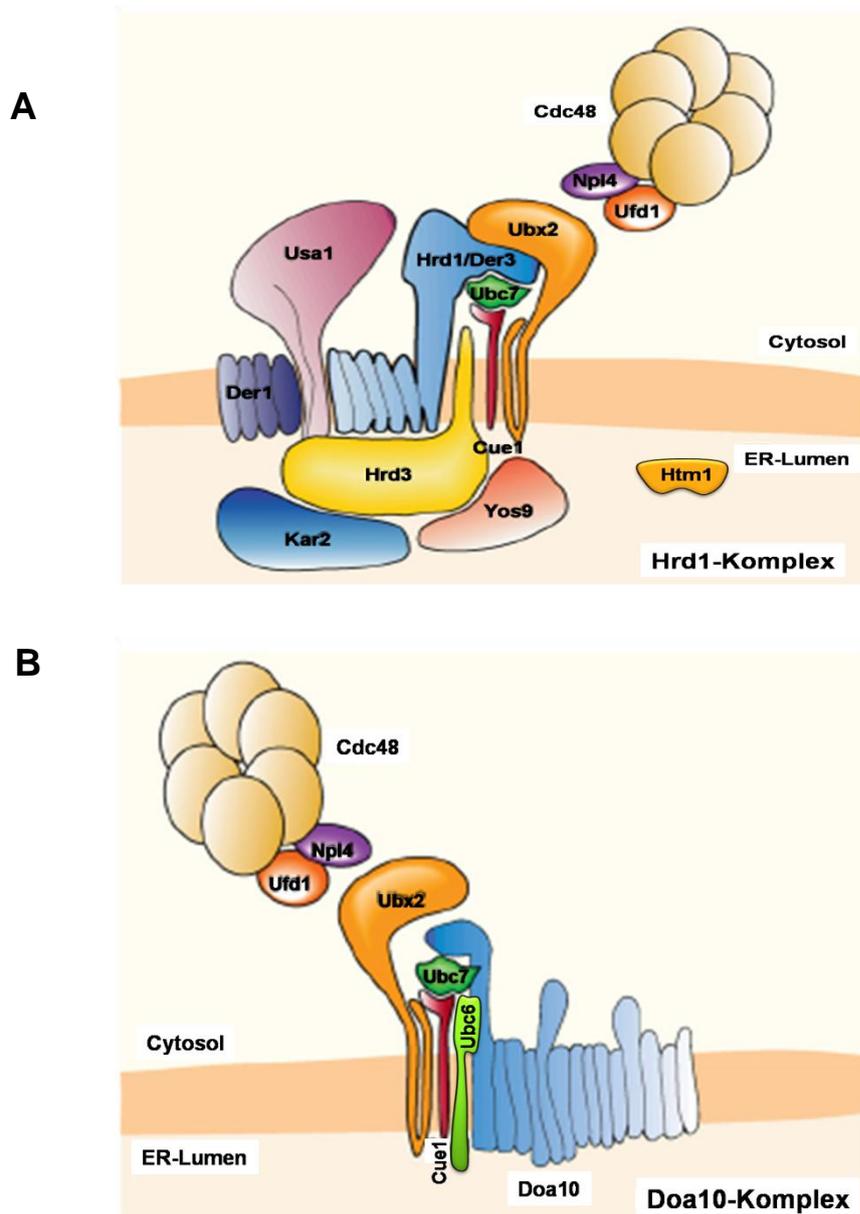
### 6.1.3 Untersuchungen zur Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten am ER-Export von K28 $\alpha$

Frühere Untersuchungen belegten, dass das reife, heterodimere K28-Toxin nach Eintritt in die sensitive Zielzelle auf die Funktionen einiger ER-Chaperone wie das Hsp70-Chaperon Kar2p mit seinen Co-Chaperonen Scj1p und Jem1p sowie Cne1p und Pdi1p angewiesen ist (Heiligenstein, 2008; Eisfeld, 2001). Entsprechende Mutanten zeigten im Agardiffusionstest eine verminderte Sensitivität bis hin zur vollständigen Toxinresistenz und akkumulierten K28 in der inneren Membranfraktion. Obwohl eine Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten und des Ubiquitin-Proteasom-Systems am ER-Export von K28- $\alpha/\beta$  bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Heiligenstein *et al.*, 2006), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob K28 $\alpha$  nach Expression im ER-Lumen ERAD-Komponenten für seinen Export in das Cytosol nutzt. Für einige invasive A/B-Toxine, zu denen auch das Shiga Toxin zählt, konnte bereits gezeigt werden, dass sie sich als ERAD-Substrate maskieren, um aus dem ER ins Cytosol transloziert zu werden (Hazes und Read, 1997; Yu und Haslam, 2004). Gleichzeitig haben diese Toxine eine Strategie entwickelt, der proteasomalen Degradation zu entgehen – ein Schicksal, das allen „gewöhnlichen“ ERAD-Substraten droht. Da die intrazelluläre Expression eines K28-Letalkonstruktes im ER einer sensitiven Hefe zur Entstehung eines Selbstkillerphänotyps führt, eignet sich dieses System hervorragend, um gezielt den Mechanismus der K28 $\alpha$ -Retrotranslokation ins Cytosol zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde das K28-Letalkonstrukt

SS-pro- $\alpha^R$  in alle verfügbaren Hefe-Deletionsstämme transformiert, die einen Defekt in einer klassischen ER-Komponente aufweisen. Die Transformanten wurden schließlich mittels Wachstumstests auf Toxinsensitivität/-resistenz getestet.

#### 6.1.3.1 Einfluss des HRD1-Komplexes auf die K28 $\alpha$ -Toxizität

Die ER-assoziierte Degradation (ERAD) ist Teil eines Qualitätskontroll-Mechanismus im ER, der fehlgefaltete Proteine spezifisch erkennt und ihrer proteasomalen Degradation im Cytosol zuführt. Nach neuesten Erkenntnissen unterscheiden sich die Abbauege verschiedener ERAD-Substrate in Abhängigkeit von der Lokalisierung ihrer fehlgefalteten Domäne. ER-luminale Substrate nutzen den sogenannten ERAD-L-Weg. Die Ubiquitin-Ligase Hrd1p übernimmt als Hauptkomponente des HRD1-Komplexes die Polyubiquitinierung des Substrates und bindet Cdc48p, dessen AAA ATPase-Funktion möglicherweise die treibende Kraft für den ER-Export bereitstellt (Bays *et al.*, 2001; Hampton *et al.*, 1996, Ye *et al.*, 2003). In diesem Komplex, der in Abbildung 31A schematisch dargestellt ist, bilden Hrd1p und Hrd3p den funktionellen Kern des HRD1-Komplexes (Gauss *et al.*, 2006), wobei das Membranprotein Hrd3p die Verbindung zwischen Substratrekrutierung im ER-Lumen und deren Ubiquitinierung durch Hrd1p darstellt und die Hrd1p-Stabilität kontrolliert (Gardner *et al.*, 2000). Neben Hrd3p ist auch Der1p an der Selektion von Substraten beteiligt, wirkt aber unabhängig von Hrd3p. Die Ligase-Funktion von Hrd1p ist abhängig von den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) Ubc7p und Ubc1p (Friedlander *et al.*, 2000), wobei Ubc7p, über Cue1p in der ER-Membran verankert, eine wichtigere Rolle zukommt. Ubx2p vermittelt die Rekrutierung des Cdc48-Komplexes an die ER-Membran (Neuber *et al.*, 2005). Htm1p erzeugt  $\alpha$ -1,6-verknüpfte Mannosylreste, die durch das Lectin-ähnliche ER-Protein Yos9p spezifisch gebunden werden.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung des HRD1 (A) und DOA10 Komplexes von *S. cerevisiae* (verändert nach Kostova *et al.*, 2007).**

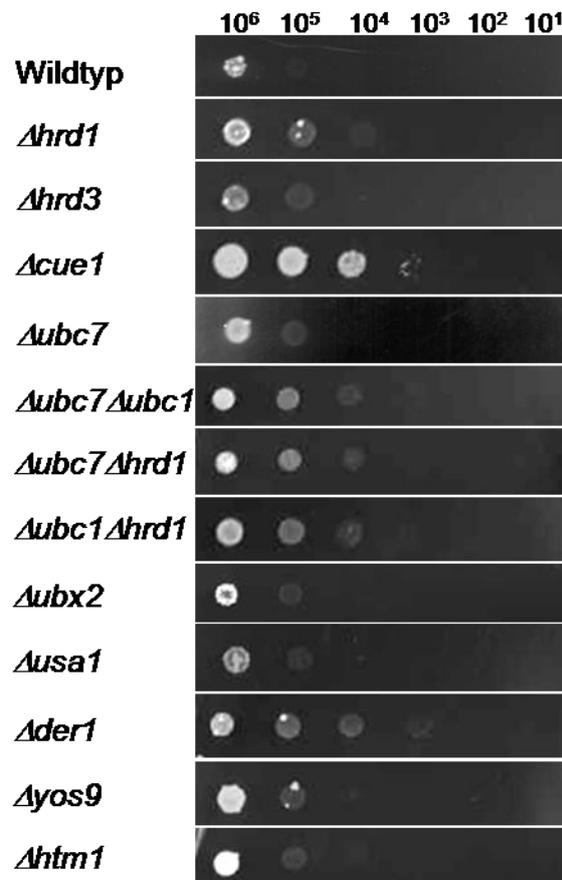
(A) Der HRD1-Ligase Komplex enthält die luminalen Komponenten Kar2p und Yos9p. Kar2p wird benötigt, um das Substrat in einer löslichen Konformation zu halten. Yos9p vermittelt zusammen mit Hrd3p die Rekrutierung der ERAD-Substrate. Htm1p ist nicht direkt mit dem Komplex assoziiert, sondern wirkt stromaufwärts von Yos9p bei der Generierung des N-Glykan-Signals für die Degradation von Glykoproteinen. Hrd1p vermittelt die Polyubiquitinierung der Substrate durch die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc7p, Ubc1p und in geringerem Maße Ubc6p. Ubx2p dirigiert den Cdc48/Ufd1/Npl4-Komplex zur ER-Membran, welcher durch die AAA ATPase-Aktivität von Cdc48p womöglich die treibende Kraft für den ER-Export fehlgefalteter Proteine bereitstellt.

(B) Der DOA10-Komplex setzt sich aus weniger Proteinen zusammen als der HRD1-Komplex und teilt sich die Komponenten der Ubiquitinierungs-Maschinerie und den cytosolischen Cdc48-Komplex mit der Hrd1p-Ligase. Die Polyubiquitinierung vermittelt die Doa10p-Ubiquitin-Ligase mit Hilfe der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc6p und Ubc7p.

Obwohl Htm1p bisher nicht als direktes Mitglied des Komplexes identifiziert werden konnte, sind beide Komponenten an der Erkennung glykosylierter ERAD-Substrate beteiligt (Bhamidipati et al., 2005; Kim et al., 2005; Vashist und Ng, 2004; Jakob et al., 2001; Denic et al., 2006). Eine weitere Komponente dieses Komplexes ist Usa1p. Das Säugerhomolog HERP dient als Rezeptor für nicht-glykosylierte BiP-Substrate (Okuda-Shimizu und Hendershot, 2007). Die Erkennung und Ubiquitinierung von Substraten mit fehlgefalteter cytosolischer Domäne (ERAD-C) wird von der Ubiquitin-Ligase Doa10p (Abbildung 31B) vermittelt. Genaue mechanistische Unterschiede sind bislang unbekannt (Carvalho et al., 2006). Alle in Abbildung 31 dargestellten Komponenten wurden auf ihre Bedeutung für die Cytotoxizität von K28 $\alpha$  untersucht. Dazu wurde in Abwesenheit des jeweiligen Genproduktes überprüft, ob die Galaktose-induzierte Expression des Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  im ER der entsprechenden Deletionsmutante einen Selbstkillerphänotyp induziert oder ob die Sensitivität gegen K28 $\alpha$  vermindert ist (Ergebnisse siehe Abbildung 32). Im Wachstumstest überlebten vor allem  $\Delta der1$  und  $\Delta cue1$  eine intrazelluläre Expression von SS-pro- $\alpha^R$  im ER und zeigten noch bei der vierten Verdünnungsstufe ein deutliches Wachstum. In Abwesenheit von *UBC7* zeigte sich ein Wachstum der Transformanten nur bei gleichzeitiger Deletion von *HRD1* oder *UBC1*. Auch ein *UBC1-HRD1*-Doppel-„Knockout“ verhielt sich vermindert sensitiv gegen das intrazellulär exprimierte Letalkonstrukt. Daneben waren auch Mutanten, bei denen die Gene *HRD1*, *YOS9* oder *HTM1* deletiert sind, in der Lage, die *in vivo* Expression des K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes zu überleben. Die Deletion der Gene, die für Hrd3p, Ubx2p und Usa1p kodieren, führte hingegen zur Ausbildung eines Selbstkillerphänotyps, der mit dem isogenen Wildtyp vergleichbar war. Ferner wurden neben diesen Deletionsmutanten temperatursensitive *kar2*-Mutanten mit Defekt in der Peptid-Bindedomäne getestet, die lediglich eine Störung in der ER-Retrotranslokation, nicht aber im ER-Import aufweisen (Kabani et al., 2003). Entsprechende Überlebenstests der Mutanten *kar2-1* und

*kar2-133* nach *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  konnten jedoch nicht ausgewertet werden, da selbst bei der permissiven Temperatur sehr starke Wachstumsdefekte auftraten.

Die Ergebnisse der Mutanten mit Defekt im ATPase-Komplex Cdc48p/Ufd1p/Npl4p sind, da sie eine essenzielle Rolle bei der Ubiquitinierung der ERAD-Substrate spielen, getrennt unter Punkt 6.2.2 aufgeführt.

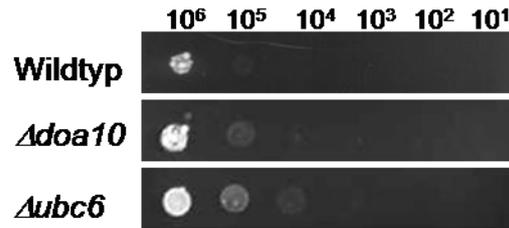


**Abbildung 32: Sensitivitätstest verschiedener Deletionsmutanten mit Defekt in ERAD-Komponenten des HRD1-Komplexes nach intrazellulärer Expression des K28-Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$ .** Verschiedene Mutanten mit Defekt in einer Komponente des HRD1-Komplexes (ERAD-L) wurden mit pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes wurde das Wachstum der einzelnen Mutanten analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen, um einen Hinweis auf eine Beteiligung der betreffenden Proteine an der K28 $\alpha$ -Toxizität zu erhalten.

### 6.1.3.2 Einfluss des DOA10-Komplexes auf die K28 $\alpha$ -Toxizität

Wie bereits erwähnt, spielt der DOA10-Komplex eine Rolle bei der Degradation fehlgefalteter Membranproteine, die einen Defekt in ihrer cytosolischen Domäne aufweisen (Swanson *et al.*, 2001). Anhand der Expression einer TAP-getaggen Doa10p-Variante unter der Kontrolle des endogenen Promotors gelang es der Arbeitsgruppe um Carvalho eine direkte Interaktion zwischen der Ubiquitin-Ligase Doa10p und Ubc7p sowie dessen Membrananker Cue1p nachzuweisen. Auch die Proteine Cdc48p (mit Cofaktor Npl4p) sowie Ubx2p wurden auf diese Weise als Komponenten des Doa10-Komplexes identifiziert (Carvalho *et al.*, 2006). Zusätzlich zu Ubc7p vermittelt hier vor allem das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc6p zusammen mit der Ubiquitin-Ligase Doa10p die Polyubiquitinierung der ERAD-C-Substrate (Hampton, 2002; Kostova *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurden zusätzlich zum HRD1-Komplex die beiden für den DOA10-Komplex spezifischen Komponenten Doa10p und Ubc6p untersucht. Dazu wurde im Wachstumstest die Sensitivität entsprechender Deletionsmutanten gegenüber einer *in vivo* Expression des Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  untersucht. Da K28 $\alpha$  ER-luminal vorliegt, war nicht zu erwarten, dass der DOA10-Komplex, der für die Degradation von Membranproteinen mit fehlgefalteter cytosolischer Domäne beschrieben ist (Carvalho *et al.*, 2006), beim ER-Export der K28 $\alpha$ -Untereinheit involviert ist. Das Ergebnis des Toxizitätstests zeigte, dass die Expression von SS-pro- $\alpha^R$  in Abwesenheit von Doa10p einen Selbstkillerphänotyp verursachte, der im Vergleich zum isogenen Wildtyp nur leicht abgeschwächt war (siehe Abbildung 33). Im Gegensatz dazu verhielt sich eine Mutante mit Deletion des *UBC6*-Gens vermindert sensitiv bei *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  im ER und überlebte bis zur dritten Verdünnungsstufe.



**Abbildung 33: Sensitivitätstest von Hefe-Deletionsmutanten mit Defekt in Komponenten des DOA10-Komplexes nach intrazellulärer Expression des K28-Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$ .** Mutanten mit Defekt in der Ubiquitin-Ligase Doa10p und des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc6p wurden mit pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Das Wachstum der Transformanten wurde nach Induktion der K28 $\alpha$ -Expression analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen.

## 6.2 Untersuchungen zur Bedeutung des Ubiquitin/Proteasom-Systems für die Retrotranslokation von K28 $\alpha$

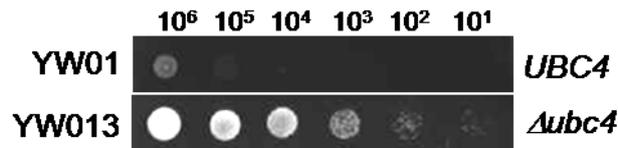
Sobald ein Protein als fehlgefaltet erkannt und mit Hilfe ER-luminaler Chaperone zu einem Protein-leitenden ER-Exportkanal dirigiert wurde, unterliegt das ERAD-Substrat einer Polyubiquitinierung durch die Wirkung einer Ubiquitin-Ligase (Hrd1p oder Doa10p) und eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (Ubc7p, Ubc1p, Ubc6p). Nach der Markierung durch Polyubiquitinketten werden die ERAD-Substrate schließlich zum 26S Proteasom befördert. Die beiden 19S-Kappen deubiquitinieren und entfalten das Substrat. Der proteolytische 20S-Kernpartikel übernimmt dann die proteasomale Degradation (Voges *et al.*, 1999). Die Erkennung und Auslieferung ubiquitinerter ERAD-Substrate zum Proteasom erfordert die Funktion der cytosolischen AAA ATPase Cdc48p (Jentsch und Rumpf, 2007). Cdc48p bildet zusammen mit seinen Co-Faktoren Ufd1p und Npl4p einen ER-assoziierten Komplex. Neben seiner Segregase-Funktion nutzt Cdc48p möglicherweise die durch ATP-Hydrolyse gewonnene Energie um das Substrat aktiv aus dem ER zu ziehen (Ye *et al.*, 2003; Ravid *et al.*, 2006; Römisch, 2005; Jentsch und Rumpf, 2007; Nakatsukasa *et al.*, 2008). Tatsächlich konnten Rabinovich *et al.* eine Akkumulation von ERAD-Substraten im ER einer *cdc48* Mutante beobachten (Rabinovich

et al., 2002). Da in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass verschiedene Komponenten des HRD1-Komplexes, darunter die Ubiquitin-Ligase Hrd1p sowie die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc6p, Ubc7p und Ubc1p, die an der Ubiquitinierung von ERAD-Substraten beteiligt sind, eine Rolle bei der Retrotranslokation von SS-pro- $\alpha^R$  spielen, sollte im Folgenden die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems für die K28 $\alpha$ -Toxizität untersucht werden.

### 6.2.1 Einfluss des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc4p auf die Retrotranslokation von K28 $\alpha$

Frühere Untersuchungen von Eisfeld zeigten, dass die K28 $\beta$ -Untereinheit in toxinbehandelten Zellen ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird. Eine Ubiquitinierung der  $\alpha$ -Untereinheit konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Eisfeld, 2001). In einem Test auf relevante Ubiquitin-konjugierende Enzyme hatte in erster Linie Ubc4p Einfluss auf die Toxinwirkung. Eine  $\Delta ubc4$ -Mutante zeigte eine stark verminderte Sensitivität gegen exogen appliziertes K28-Toxin. Mutanten, in denen zusätzlich zu *UBC4* auch *UBC6* oder *UBC7* deletiert waren, wiesen sogar eine vollständige Resistenz auf. Dieses E2-Enzym Ubc4p wirkt hauptsächlich im proteasomalen Abbau kurzlebiger und abnormaler Proteine (Sommer und Seufert, 1992). Da Ubc4p allerdings auch an der Monoubiquitinierung von Membranrezeptoren beteiligt ist und Hefen nach Toxin-Inkubation und subzellulärer Fraktionierung K28 schon auf Ebene der Plasmamembran akkumulieren, konnte bislang eine Beteiligung des Enzyms an der Retrotranslokation aus dem ER nicht bestätigt werden (Heiligenstein, 2008). Die intrazelluläre Expression von K28 $\alpha$  mit Signalsequenz erlaubte nun die gezielte Untersuchung einer Beteiligung von Ubc4p am Retrotranslokationsmechanismus von K28 $\alpha$ . Um zu testen, welche Auswirkung Ubc4p auf die Toxinwirkung hat, wurden die Stämme YW013 ( $\Delta ubc4$ ) und YW01 (*UBC4*) mit dem Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert und das Überleben der Mutante nach Induktion der Expression in Medium mit 2% Galaktose analysiert.

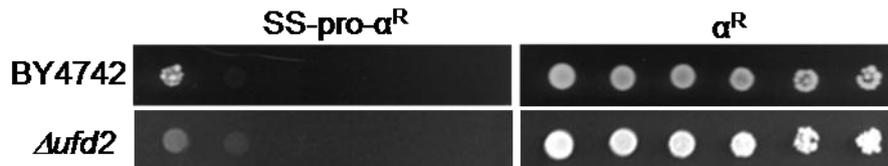
Wie aus Abbildung 34 hervorgeht, zeigte sich die  $\Delta ubc4$ -Mutante nahezu vollständig toxinresistent. Aus dieser Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass Ubc4p nicht nur bei der Internalisierung des Rezeptor-Toxin-Komplexes eine essenzielle Funktion zukommt, sondern auch intrazellulär wesentlich zur K28 $\alpha$ -Aktivität beiträgt, sei es durch Vermittlung der Retrotranslokation oder der Cytotoxizität.



**Abbildung 34: Sensitivitätstest einer Mutante mit Defekt im Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc4p nach *in vivo* Expression von SS-pro- $\alpha^R$ .** Der *S. cerevisiae* Stamm YW013, bei dem der *UBC4*-ORF fehlt, sowie sein isogener Wildtyp YW01 wurden mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach Induktion der K28 $\alpha$ -Expression wurde das Wachstum der einzelnen Mutanten analysiert und mit dem des sensitiven Wildtyps verglichen.

### 6.2.2 Einfluss des E4 Enzyms Ufd2p auf die Retrotranslokation von K28 $\alpha$

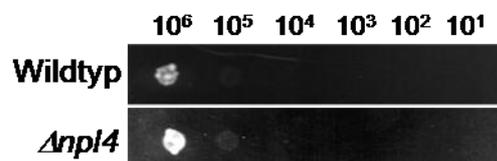
Ufd2p ist das erste bislang identifizierte E4 Enzym, das Mono-/Di-Ubiquitinreste zu einer Polyubiquitinkette verlängert (Koegl *et al.*, 1999). Ufd2p und Cdc48p versehen ERAD-Substrate mit einer verkürzten Ubiquitinstruktur aus vier bis sechs Resten. Diese Oligoubiquitinketten werden von den Zulieferproteinen Rad23p und Dsk2p erkannt und zum Proteasom dirigiert (Richly *et al.*, 2005). Hier wurde eine entsprechende  $\Delta ufd2$  Nullmutante auf Sensitivität gegen eine Expression von K28 $\alpha$  im ER untersucht. Wie aus Abbildung 35 hervorgeht, zeigten  $\Delta ufd2$  Zellen im Vergleich zum Wildtyp kein stärkeres Wachstum, was darauf hinweist, dass Ufd2p nicht für die Toxizität von K28 $\alpha$  benötigt wird.



**Abbildung 35: Sensitivitätstest einer Mutante mit Defekt im E4 Enzym Ufd2p nach *in vivo* Expression von SS-pro- $\alpha^R$ .** *S. cerevisiae* Wildtyp und  $\Delta ufd2$  Mutante wurden mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Das Wachstum der Mutante wurde nach Induktion der K28 $\alpha$ -Expression analysiert und mit dem des sensitiven Wildtyps BY4742 verglichen.

### 6.2.3 Untersuchungen zur Beteiligung des CDC48-Komplexes an der Retrotranslokation von K28 $\alpha$

Um den Einfluss des CDC48-Komplexes auf die Translokation von K28 $\alpha$  zu testen, wurden Hefemutanten der entsprechenden Gene auf ihre Toxinsensitivität untersucht. Wie alle temperatursensitiven Mutanten ließen sich jedoch auch *cdc48-3* und *ufd1-1* im Wachstumstest nicht auswerten. Lediglich eine  $\Delta npl4$ -Deletionsmutante konnte nach intrazellulärer Expression des Letalkonstruktes auf Überleben getestet werden. In Abwesenheit des Co-Faktors Npl4p kam es zur Ausbildung eines Selbstkillerphänotyps, der dem des isogenen Wildtyps entsprach (siehe Abbildung 36). Somit konnte keine Beteiligung des CDC48-Komplexes nachgewiesen werden.

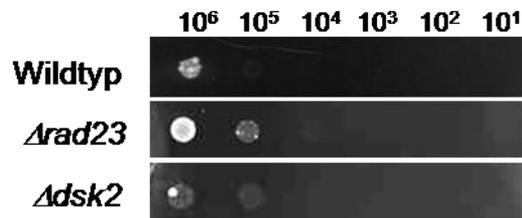


**Abbildung 36: Sensitivitätstest einer *NPL4*-Nullmutante nach intrazellulärer Expression eines K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes.** Der *S. cerevisiae* Stamm  $\Delta npl4$  sowie der isogene Wildtyp BY4742 wurden mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes wurde das Wachstum der Mutante analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen, um einen Hinweis auf eine Beteiligung von Npl4p an der K28 $\alpha$ -Toxizität zu erhalten.

#### 6.2.4 Untersuchungen zur Bedeutung der ubiquitinbindenden Proteine Rad23p und Dsk2p für die Retrotranslokation von K28 $\alpha$

In einem genomischen „Screen“ von 5000 Hefe-Deletionsmutanten wurden Rad23p und Dsk2p als essenzielle ERAD-Komponenten identifiziert (Medicherla *et al.*, 2004). Diese beiden cytosolischen polyubiquitinbindenden Proteine transferieren ubiquitinierte ER-Substrate zum Proteasom (Wilkinson *et al.*, 2001; Chen und Madura, 2002; Funakoshi *et al.*, 2002; Hartmann-Petersen *et al.*, 2003), nachdem diese mit Hilfe des trimeren Cdc48/Ufd1/Npl4-Komplexes von der ER-Membran freigesetzt wurden. Dadurch wird ein störungsfreier Weg von der ER-Membran zum Proteasom gewährleistet, der die Bildung unlöslicher Proteinaggregate im Cytoplasma verhindert. In einer  $\Delta dsk2\Delta rad23$ -Doppelmutante kommt es zu einer starken Stabilisierung der ERAD-Substrate CPY\*-HA und CTG\*, wobei ubiquitiniertes CPY\*-HA im Cytosol akkumuliert. Da neben Deg1-GFP jedoch auch weitere ERAD-Substrate unabhängig von Dsk2p oder Rad23p degradiert werden, scheinen diese beiden Zubringerproteine spezifisch am Degradierungsweg einzelner Ubiquitin-Proteine teilzuhaben (Medicherla *et al.*, 2004). Heiligenstein zeigte, dass sowohl  $\Delta dsk2$  als auch  $\Delta rad23$ -Zellen im Agardiffusionstest gegen exogenes K28-Toxin 100% Wildtypsensitivität aufweisen (Heiligenstein *et al.*, 2006). Durch Wachstumstests von  $\Delta dsk2$ - und  $\Delta rad23$ -Deletionsmutanten sollte im Folgenden nach *in vivo* Expression eines K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes überprüft werden, welchen Einfluss die Abwesenheit dieser Zubringermoleküle auf die Toxizität von K28 $\alpha$  hat. Im Vergleich zum isogenen Wildtyp BY4742 bewirkte die Deletion des *RAD23*-Gens hier eine schwache Abnahme der Toxinsensitivität. Wie aus Abbildung 37 hervorgeht, zeigte die betreffende  $\Delta rad23$  Mutante selbst bei der dritten Verdünnungsstufe noch ein leichtes Wachstum. Die  $\Delta dsk2$ -Mutante brachte hingegen keinen aussagekräftigen Phänotyp hervor, zwar ließ

sich in der zweiten Verdünnung noch ein leichtes Zellwachstum nachweisen, insgesamt war das Wachstum jedoch vergleichbar schwach.



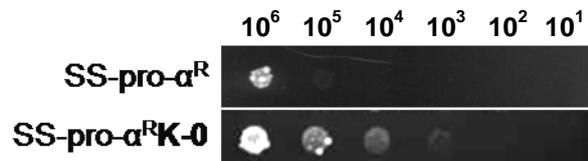
**Abbildung 37: Vergleichender Wachstumstest zum Nachweis der Bedeutung zweier cytosolischer polyubiquitinbindender Proteine für die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$ .** Die beiden Deletionsmutanten  $\Delta dsk2$  und  $\Delta rad23$  wurden mit pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes wurde das Wachstum der einzelnen Mutanten analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen, um einen Hinweis auf eine Beteiligung von Rad23p und Dsk2p an der K28 $\alpha$ -Toxizität zu erhalten.

## 6.2.5 Untersuchungen zur Ubiquitinierung der K28 $\alpha$ -Untereinheit in einer wildtypischen und einer Lysin-freien Variante nach intrazellulärer Expression von SS-pro- $\alpha^R$

### 6.2.5.1 Einfluss der Lysinreste in K28 $\alpha$ auf die *in vivo*-Toxizität

Um einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Ubiquitinierung von K28 $\alpha$  und deren Bedeutung für die Retrotranslokation zu erhalten, wurde eine Lysin-freie Variante von SS-pro- $\alpha^R$  eingesetzt, die im Rahmen der Dissertation von Sendzig entstanden war. In diesem Derivat (SS-pro- $\alpha^R$ K-0) wurden die drei internen Lysinreste der  $\alpha$ -Untereinheit (an Position 74, 135 und 139) durch Arginine ausgetauscht (Sendzig, 2006). Folglich sollte eine Ubiquitinierung der  $\alpha$ -Untereinheit blockiert sein. Nach intrazellulärer Expression in dem *S. cerevisiae* Wildtypstamm SEY6210 erwies sich diese Variante jedoch noch toxisch. Wurden alle vier Lysinreste in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von K28 durch Argininreste ersetzt, war ein starker Aktivitätsverlust des sezernierten Toxins von etwa 60% im Vergleich zum Wildtyp-toxin zu beobachten. Eine Western Blot Analyse ergab jedoch gleichzeitig eine

verminderte Sekretionsrate der entsprechenden Toxinvarianten (Sendzig, 2006). In dieser Arbeit wurde die Wildtyphefe *S. cerevisiae* BY4742 mit SS-pro- $\alpha^R$  und dem Lysin-freien Konstrukt transformiert und die Toxizität beider Derivate durch Analyse der Lebensfähigkeit entsprechender Transformanten bestimmt. Im Unterschied zum Letalkonstrukt, hatte die Lysin-freie Variante ihre Toxizität fast vollständig verloren und die entsprechend transformierten Hefen überleben die *in vivo* Expression von SS-pro- $\alpha^R$ K-0 mindestens bis zur vierten Verdünnungsstufe (vgl. Abbildung 38). Dieser Toxizitätstest deutete darauf hin, dass die  $\alpha$ -Untereinheit innerhalb des Letalkonstruktes ubiquitiniert wird und diese Ubiquitinierung eine wesentliche Rolle beim ER-Export von K28 $\alpha$  spielt. Ein vollständiger Aktivitätsverlust konnte nicht beobachtet werden, auch nach Entfernen der Lysinreste blieb eine Restaktivität erhalten.



**Abbildung 38: Toxizitätsnachweis der Lysin-freien K28 $\alpha$ -Variante SS-pro- $\alpha^R$ K-0.** Der sensitive Wildtyp-Stamm *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit zwei K28 $\alpha$ -Varianten transformiert: mit dem Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  und einer entsprechenden Lysin-freien Variante, in der die drei internen Lysine in  $\alpha$  (an den Positionen 74, 135 und 139) durch Arginine ersetzt wurden (Sendzig, 2006). Die Toxin-Konstrukte befanden sich im TOPO-Vektor pYES2.1 unter der Transkriptionskontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors  $P_{GAL1}$ . Nach *in vivo* Expression beider K28 $\alpha$ -Derivate wurde das Wachstum der Transformanten verglichen, um den Einfluss der internen Lysinreste als potenzielle Ubiquitinierungsstellen auf die K28 $\alpha$ -Toxizität zu analysieren.

### 6.2.6 Analyse der K28 $\alpha$ -Toxizität nach gleichzeitiger Überexpression einer mutierten Ubiquitinform mit Defekt in der Bildung von Polyubiquitinketten

Innerhalb von Polyubiquitinketten, die Proteine für die proteasomale Degradation markieren, sind die einzelnen Ubiquitin-Reste über den C-Terminus eines Moleküls mit dem Lysin 48 des vorherigen Ubiquitins verknüpft (Chau *et al.*, 1989; Hershko und Ciechanover, 1998). Arnason und Ellison zeigten, dass die Aneinanderreihung mehrerer Ubiquitin-Moleküle *in vivo* auch an zwei weiteren Lysin-Positionen erfolgen kann, an Lysin 29 und Lysin 63. Die Bildung der alternativen Verknüpfungen hängt in hohem Maße von der Funktion der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc4p und Ubc5p ab. Durch die Überexpression einer mutierten Ubiquitin-Variante, in der die Lysin-Reste 48 und 63 durch Arginine ersetzt wurden, wird nach Einbau dieser UbRR<sup>48/63</sup>-Moleküle die Bildung von Polyubiquitinketten gehemmt (Arnason und Ellison, 1994). Da eine solche Polyubiquitinierung jedoch als Signal für den proteasomalen Abbau von ERAD-Substraten dient und vermutlich für deren ER-Export essenziell ist, sollten nicht-ubiquitinierte Substrate im ER akkumulieren. Eine Akkumulation von K28 $\alpha$  im ER sollte wiederum zu einem Toxizitätsverlust führen, da in diesem Fall das toxische Signal nicht in den Zellkern vermittelt werden kann. Der sensitive Wildtyp-Stamm *S.cerevisiae* SEY6210 wurde mit dem Letalkonstrukt pYE2.1/SS-pro- $\alpha^R$  sowie dem „high copy“ Plasmid pW021 cotransformiert, welches die Expression der mutierten Ubiquitin-Variante UbRR<sup>48/63</sup> durch Induktion des Kupferpromotors *CUP1* mit 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> erlaubt (Arnason und Ellison, 1994). Abbildung 39 zeigt, dass die alleinige Expression der mutierten Ubiquitin-Variante keinen Wachstums-hemmenden Effekt auf SEY6210 hatte. Entsprechende Hefen wuchsen bis zur letzten Verdünnungsstufe hoch (ura trp d/o Glukose + 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>). Nach alleiniger Expression der Toxinvariante, bildete sich hingegen ein deutlicher Selbstkillerphänotyp aus (ura trp d/o Galaktose, ohne CuSO<sub>4</sub>). In Selektionsmedium mit 2% Galaktose und nach Zusatz von 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, was zur Coexpression

des K28-Letalkonstruktes und des mutierten Ubiquitins führte, konnte keine Toxinaktivität mehr nachgewiesen werden. Die Transformanten zeigten eine vollständige Resistenz gegen K28 $\alpha$ . Dieses Experiment unterstützt somit die These, dass K28 $\alpha$  polyubiquitiniert werden muss, um ins Cytosol zu gelangen.

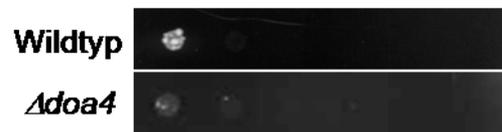


**Abbildung 39: Untersuchung der K28 $\alpha$ -Toxizität nach gleichzeitiger Überexpression einer mutierten Ubiquitinvariante UbRR<sup>48/63</sup>.** *S. cerevisiae* SEY6210 wurde mit pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  und dem Plasmid pW021 cotransformiert. Bei pW021 handelt es sich um ein „high copy“ Plasmid mit *TRP1*-Marker, in dem die mutierte Ubiquitin-Variante UbRR<sup>48/63</sup> unter Transkriptionskontrolle des induzierbaren Kupferpromotors steht. Die Cotransformanten wurden in *ura trp d/o* Raffinose angezogen und eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden je 5  $\mu$ l auf eine *ura trp d/o* Galaktoseplatte mit 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> getropft, um die Expression des K28-Derivates sowie von Ubiquitin zu induzieren. Als Kontrolle diente einmal eine Platte mit 2% Galaktose ohne Zusatz von CuSO<sub>4</sub>, so dass lediglich K28 $\alpha$  exprimiert wurde. Zwei weitere Kontrollen wurden auf Glukose-Platten mit bzw. ohne CuSO<sub>4</sub>-Zusatz getropft.

### 6.2.7 Phänotypische Charakterisierung einer Deletionsmutante mit Defekt im deubiquitinierenden Enzym Doa4p

Die Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung erfüllt vielfältige Funktionen. So dient die Ubiquitinierung von Membranrezeptoren und anderen Plasmamembran-Proteinen als Sortiersignal für deren Internalisierung und anschließende vakuoläre Degradation (Hicke, 1999), wohingegen eine Polyubiquitinierung kurzlebige oder fehlgefaltete Proteine für den Abbau im 26S Proteasom markiert (Sommer und Seufert, 1992). Aufgrund einer Vielzahl von deubiquitinierenden Enzymen (DUBs), welche die Disassemblierung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten katalysieren, ist der Prozess der Ubiquitinierung reversibel. Einige DUBs sind mit dem Proteasom assoziiert. Zu einem der wichtigsten Proteasom-assoziierten DUBs

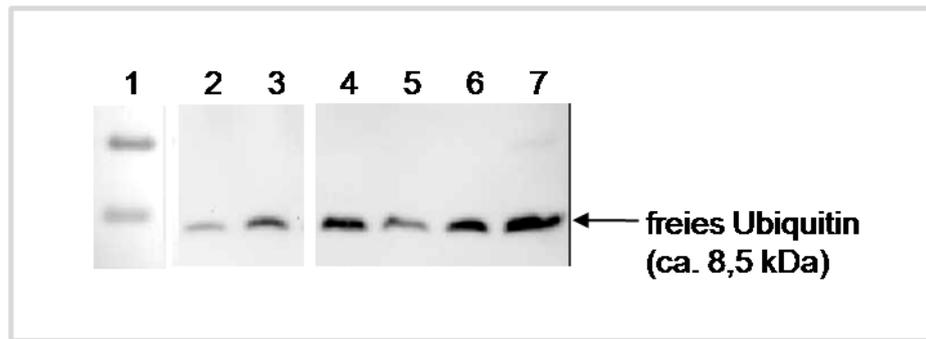
zählt auch Doa4p (Guterman und Glickman, 2004). Diese Ubiquitin-Hydrolase ist zudem verantwortlich für die Deubiquitinierung von Cargomolekülen in „multi vesicular bodies“ (MVBs), und verhindert so den Abbau der Ubiquitin-Reste in der Vakuole. Allgemein ist die Deubiquitinierung von Vakuole- und Proteasom-gesteuerten Proteinen notwendig für das Ubiquitin-Recycling (Swaminathan *et al.*, 1999). Ein Defekt in diesem Prozess führt zur Degradation der langlebigen Ubiquitin-Moleküle, wodurch es in der Zelle zu einem Mangel an freiem, monomeren Ubiquitin kommt (Nikko und André, 2007). Durch intrazelluläre Expression eines K28-Letalkonstruktes im ER einer  $\Delta doa4$ -Mutante sollte analysiert werden, ob bei Verlust des Deubiquitinierungsenzyms eine Stabilisierung von K28 $\alpha$  erfolgt. Dazu wurde die Mutante mit pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert und das Wachstum in verschiedenen Verdünnungsstufen überprüft. Wie aus Abbildung 40 entnommen werden kann, bildete sich keine Resistenz gegen K28 $\alpha$  aus, sondern es entstand ein Selbstkillerphänotyp, der im Vergleich zum isogenen Wildtyp fast noch stärker ausgeprägt war.



**Abbildung 40: Wachstumstest einer  $\Delta doa4$  Mutante mit Defekt in der Deubiquitinierung.** Eine  $\Delta doa4$ -Nullmutante wurde mit dem Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes wurde das Wachstum der  $\Delta doa4$  Mutante analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen.

### 6.2.8 Immunpräzipitation zum direkten Nachweis einer Ubiquitinierung von K28 $\alpha$

Bislang deuteten die meisten Ergebnisse auf eine Ubiquitinierung von K28 $\alpha$ . Um einen direkten Nachweis hierfür zu erbringen, wurden die V5-getaggten K28 $\alpha$ -Derivate (SS-)pro-V5- $\alpha^R$  in der Hefe SEY6210 exprimiert. Als Negativkontrollen dienten zum einen Lysin-freie K28-Varianten aus der Arbeit von Sendzig, zum anderen die betreffenden Vektorkontrollen. Zur Herstellung des Zelllysates wurden die Hefetransformanten in 50 ml ura d/o Galaktose-Medium ü.N. angezogen und je  $2 \times 10^9$  Zellen mittels Glasperlen aufgeschlossen. Die Proteine wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  mit Aceton/Methanol gefällt, in 1x PBS aufgenommen und die Proteinlösungen anschließend zur Immunpräzipitation eingesetzt. Dazu wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  Zelllysats mit 5  $\mu\text{l}$  anti-K28-Antikörper zu 100  $\mu\text{l}$  Protein A-Sepharose (Vorbehandlung, siehe unter 4.7, Material und Methoden) pipettiert und die Ansätze nach Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails ü.N. bei  $4^\circ\text{C}$  auf einem Drehrad inkubiert. Durch Zugabe von reduzierendem SDS-Probenpuffer und fünfminütiger Denaturierung der Proben bei  $95^\circ\text{C}$  wurden die Antikörperkomplexe von den Sepharose-„Beads“ gelöst und nach Auftrennung in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel geblottet. Die Entwicklung erfolgte mit anti-Ubiquitin-Antikörper und Chemi-lumineszenz. Der Western Blot ist in Abbildung 41 dargestellt. Bei allen Proben inklusive der Negativkontrollen zeigte sich dieselbe unspezifische Bande auf einer Höhe von etwa 8 bis 9 kDa. Vermutlich handelte es sich hierbei um freies, monomeres Ubiquitin, das mit einer Größe von 8,5 kDa beschrieben ist. Daneben waren keine konstruktsspezifischen Ubiquitin-Banden nachweisbar. Auch mittels „Pulse“-Experiment nach „Labeling“ von SS-pro- $\alpha^R$  mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin gelang kein direkter Nachweis einer ubiquitinierten Form von K28 $\alpha$  (nicht gezeigt).



**Abbildung 41: Immunpräzipitation zum Nachweis einer möglichen Ubiquitinierung von K28 $\alpha$ .** Zellen der Wildtyp-Hefe SEY6210 wurden mit einer cytosolischen oder luminalen V5-getaggten K28 $\alpha$ -Variante (SS-)pro-V5- $\alpha^R$  transformiert. Als Negativkontrollen dienten die Lysin-freien K28-Varianten ppto $x^{K-0}$ ,  $\alpha/\beta^{K-0}$  und  $\alpha/\beta^{K-74}$  von Sendzig (2006) sowie der pYES2.1 Leervektor. Nach Glasperlen-Aufschluss von je  $2 \times 10^9$  Zellen und Aceton/Methanol-Fällung wurden 500  $\mu$ l jeder Probe zur Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitate wurden nach Zusatz von 40  $\mu$ l reduzierendem SDS-Probenpuffer 5 min bei 95°C denaturiert und 30  $\mu$ l jedes Überstandes auf ein 10%-iges Tris/Tricin-Gel aufgetragen. Das Gel wurde geblottet und der Blot mit anti-Ubiquitin-Antikörper (1:400) und sekundärem HRP-gekoppeltem anti-„mouse“-Antikörper mittels Chemilumineszenz entwickelt.

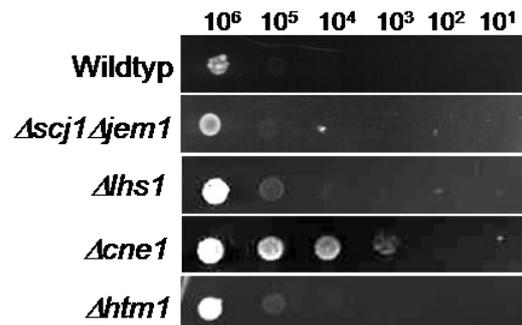
Spur 1: Protein-Standard (PageRuler Prestained, Fermentas)  
 Spur 2: pro-V5- $\alpha^R$   
 Spur 3: SS-pro-V5- $\alpha^R$   
 Spur 4: ppto $x^{K-0}$   
 Spur 5:  $\alpha/\beta^{K-0}$   
 Spur 6:  $\alpha/\beta^{K-74}$   
 Spur 7: pYES2.1 Leervektor

### 6.3 Einfluss cytosolischer und ER-luminaler Chaperone auf die Retrotranslokation von K28 $\alpha$

Molekulare Chaperone spielen eine wesentliche Rolle bei der Auswahl von ERAD-Substraten (Nishikawa *et al.*, 2001; 2005; Denic *et al.*, 2006). Während Chaperon-ähnliche Lectine wie Calnexin spezifische N-Glykanstrukturen fehlgefalteter Proteine erkennen, binden Hsp70 Chaperone wie Kar2p vermutlich hydrophobe Peptidbereiche, die im nativen Zustand im Inneren des Proteins liegen (Helenius und Aebi, 2004; Plemper *et al.*, 1997; Bukau und Horwich, 1998). Ob Kar2p und Hsp40-Co-Chaperone an der Erkennung jedes ERAD-Substrates beteiligt sind, ist noch unbekannt (Vembar und Brodsky, 2008).

Im Gegensatz zu fehlgefalteten luminalen ERAD-Substraten, werden Membranproteine mit „Blessuren“ in einer langen cytoplasmatischen Domäne von cytosolischen Hsp70- und Hsp40-Chaperonen gebunden, wie es bereits für die Degradation von CFTR gezeigt werden konnte (Zhang *et al.* 2001, Youker *et al.*, 2004). Im Folgenden wurden verschiedene Chaperonmutanten auf veränderte Sensitivität gegen ein intrazellulär exprimiertes K28-Letalkonstrukt getestet, um Hinweise auf deren Beteiligung am Retrotranslokationsmechanismus von K28 $\alpha$  zu erhalten. Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass Kar2p für die Zielsteuerung des internalisierten K28-Toxins ins Cytosol der Zielzelle verantwortlich ist. So akkumuliert das Toxin in einer *kar2-203*-Mutante zum größten Teil in der inneren Membranfraktion und gelangt nicht mehr ins Cytosol (Eisfeld, 2001; Heiligenstein *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden zwei Mutanten (*kar2-1* und *kar2-133*) getestet, die einen Defekt in der Degradation der löslichen Substrate A1PiZ *in vivo* und p $\alpha$ F *in vitro* aufweisen (Brodsky *et al.*, 1999; McCracken und Brodsky, 1996). Aufgrund von schweren Wachstumsdefekten lieferten betreffende Überlebenstests jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse (nicht dargestellt). DnaJ-ähnliche Proteine regulieren den ATP-abhängigen Reaktionszyklus von Kar2p und anderen Hsp70-Chaperonen (Kelley, 1998). Nishikawa und Mitarbeiter wiesen eine Beteiligung der beiden DnaJ-Domänen-haltigen Hsp40-Co-Chaperone Scj1p und Jem1p beim ERAD der künstlichen Substrate CPY\* und  $\Delta$ Gp $\alpha$ F nach (Nishikawa *et al.*, 2001; Schlenstedt *et al.*, 1995). Beide fehlgefalteten Proteine aggregieren in einer temperatursensitiven *kar2*-Mutante und nach Doppel-„Knock-out“ von *SCJ1* und *JEM1*. Eine entsprechende Mutante  $\Delta$ *scj1* $\Delta$ *jem1* verhielt sich komplett resistent gegen exogene Toxin-Applikation und zeigte nach subzellulärer Fraktionierung eine Akkumulation von K28 in inneren Membranen (Heiligenstein, 2008). Wurde jedoch ein K28-Letalkonstrukt (SS-pro- $\alpha^R$ ) im ER einer sensitiven Hefe exprimiert, kam es, wie beim isogenen Wildtyp, zur Ausbildung eines Selbstkiller-Phänotyps (vgl. Abbildung 42). Der hydrolytische Hsp70-Zyklus erfordert zudem die Freisetzung

von ADP, welche durch Nukleotid-Austauschfaktoren (NEFs) bewerkstelligt wird. Eines dieser NEFs ist Lhs1p, ein ER-Chaperon mit 24% Homologie zu BiP (Craven *et al.*, 1996). Bei Deletion des *LHS1*-Locus war die Sensitivität gegen K28 $\alpha$  nicht vermindert, auch hier kam es zur Bildung eines Suizid-Phänotyps. Hefezellen mit einer Deletion im Calnexin-kodierenden *CNE1*-Gen (Parlati *et al.*, 1995) verhielten sich resistent gegen K28 (Eisfeld *et al.*, 2000). Nach intrazellulärer Expression von K28 $\alpha$  im ER bildete sich ebenfalls eine fast vollständige Resistenz aus. Ein weiteres Lectin-ähnliches Protein stellt das ER-Protein Htm1p (oder Mnl1p) dar. Dieses  $\alpha$ -Mannosidase-ähnliche Protein ist involviert in die Degradation glykosylierter Proteine, indem es deren Man8-Rest nach Spaltung durch die  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I erkennt (Hosokawa *et al.*, 2001; Nakatsukasa *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2001).

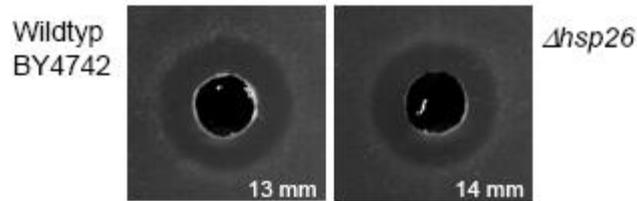


**Abbildung 42: Untersuchung ER-luminaler Chaperone auf Veränderungen der Sensitivität gegen intrazellulär exprimiertes K28 $\alpha$ .**

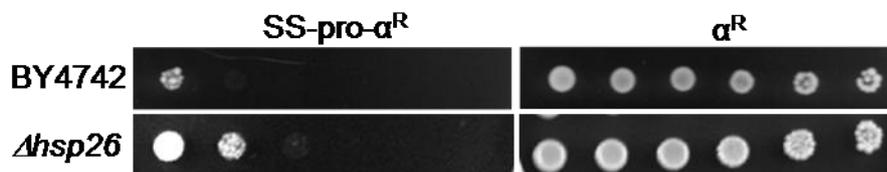
Mutanten mit Defekt in der Aktivität verschiedener ER-luminaler Chaperone wurden mit dem Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes wurde das Wachstum der einzelnen Mutanten analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen.

Neben ER-luminalen Chaperonen wurde eine Reihe cytosolischer Chaperon-Mutanten auf Sensitivität/Resistenz gegen K28 $\alpha$  untersucht. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt zwei Klassen cytosolischer Hsp70 Chaperone, kodiert durch Gene der SSA- und SSB-Genfamilien (Boorstein *et al.*, 1994). Während die Ssb-Proteine hauptsächlich an der Proteintranslokation beteiligt sind (Pfund *et al.*, 1998), vermitteln die vier cytosolischen Hsp70 Chaperone der SSA-Genfamilie Ssa1-4p eine Vielzahl Chaperon-abhängiger Funktionen und spielen eine

signifikantere Rolle bei der Degradation integraler Membransubstrate. Zhang und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) in einem Hefestamm mit einem temperatursensitiven *SSA1*-Allel, welchem die Proteine Ssa2-4p funktionell fehlen, bei der höheren Temperatur im ER stabilisiert wird (Zhang *et al.*, 2001). Während eine Deletion von *SSA1* und *SSA3* lediglich einen schwachen Einfluss auf die K28- $\alpha$ -Toxizität hatte, reagierten Hefen in Abwesenheit von Ssb1p weniger sensitiv auf die intrazelluläre Expression von SS-pro- $\alpha^R$  und zeigten auch in der zweiten und dritten Verdünnungsstufe noch schwaches Zellwachstum (siehe Abbildung 13). Da das Hsp40 Co-Chaperon Ydj1p die ATPase-Aktivität von Ssa1p stimuliert (Cyr *et al.*, 1992) und gezeigt werden konnte, dass *YDJ1* und *SSA1* genetisch interagieren (Becker *et al.*, 1996), wurde ferner eine Mutante mit *YDJ1*-Deletion auf K28 $\alpha$ -Sensitivität untersucht. Eine solche Mutante bildete eine klare Resistenz gegen das K28-Letalkonstrukt aus. Die Abwesenheit eines weiteren cytosolischen Hsp40 Co-Chaperons, Hlj1p, führte nur zu einer geringfügig verminderten Sensitivität als Antwort auf die *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  im ER einer entsprechenden Deletionsmutante (siehe Abbildung 13). Das kleine cytosolische Hitzeschockprotein Hsp26p wirkt Proteinaggregationen entgegen (Haslbeck *et al.*, 2005). Ahner und Mitarbeiter beobachteten eine reduzierte CFTR-Degradation in  $\Delta$ *hsp26*-Zellen im Vergleich zum isogenen Wildtyp. Eine  $\Delta$ *hsp26*-Nullmutante verhielt sich im Agardiffusionstest gegen exogen appliziertes K28-Toxin so sensitiv wie der Wildtyp BY4742 (vgl. Abbildung 43). Allerdings konnte nach intrazellulärer Expression einer letalen K28 $\alpha$  Variante eine verminderte Sensitivität der Deletionsmutante beobachtet werden (Abbildung 44).

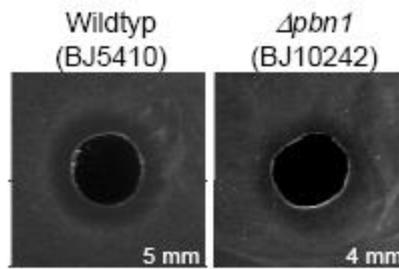


**Abbildung 43: Agardiffusionstest zum Nachweis der K28-Sensitivität einer  $\Delta hsp26$ -Nullmutante.** Die Deletionsmutante  $\Delta hsp26$  sowie der isogene Wildtyp BY4742 wurden ü.N. in YEPD-Medium angezogen und jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 7,5 ml Minimalagar mit Methylenblau (pH 4,7) eingebettet. Die Hefen wurden nach Zugabe von 100  $\mu$ l K28-Toxinkonzentrat drei Tage bei 20°C inkubiert. Die Hemmhofdurchmesser sind rechts in Millimetern angegeben.



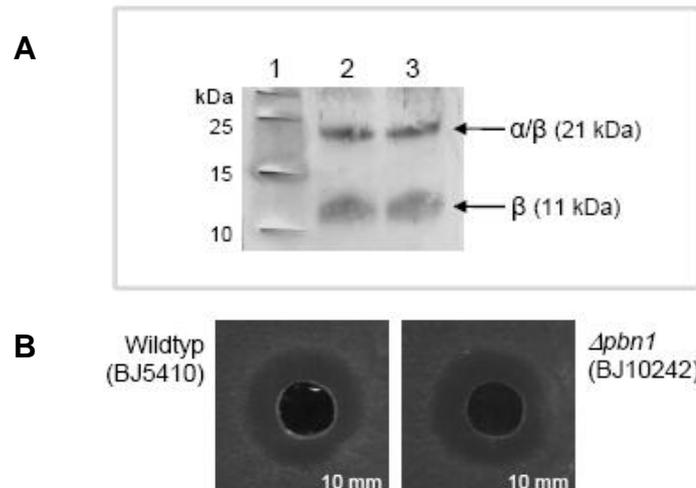
**Abbildung 44: Untersuchung des kleinen Hitzeschockproteins Hsp26p auf Veränderungen der Sensitivität gegen intrazellulär exprimiertes K28 $\alpha$ .** Eine Mutante mit Defekt in der Aktivität des cytosolischen Chaperons Hsp26p wurde mit dem Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes wurde das Wachstum der Mutante analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen, um einen Hinweis auf eine Beteiligung von Hsp26p an der K28 $\alpha$ -Toxizität zu erhalten.

Darüberhinaus wurde ein Hefestamm getestet, der das Gen *PBN1* unter der Kontrolle des *GAL*-Promotors trägt. Bei *PBN1* handelt es sich um ein essenzielles Gen, das für ein ER Typ-I Membranprotein kodiert. In Abwesenheit von Pbn1p ist die ER-assoziierte Degradation von CPY\* blockiert. Es kommt zu einem Defekt in der Proteinfaltung und infolgedessen zu einem signifikanten Anstieg der UPR-Antwort (Subramanian *et al.*, 2005). Im Agardiffusionstest gegen exogen appliziertes K28-Toxin zeigte die  $\Delta pbn1$ -Mutante keine nennenswerte Abnahme der Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp BJ5410. (siehe Abbildung 45).



**Abbildung 45: Agardiffusionstest zur Untersuchung der Sensitivität einer  $\Delta pbn1$ -Mutante gegen exogenes K28-Toxin.** Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen einer frischen  $\ddot{u}$ .N.-Kultur der Stämme BJ5410 (Wildtyp) und BJ10242 (in YPGal angezogen; *PBN1* hinter *GAL*-Promotor) wurden in 15 ml Methylenblauagar Glukose (pH 4,7) eingebettet. In die Mitte der Platten wurde ein Loch gestanzt, in das 100  $\mu$ l K28-Toxinkonzentrat pipettiert wurden. Nach dreitägiger Bebrütung der Platten bei 20°C wurde der Durchmesser der zellfreien Hemmzone ausgemessen. Die Hemmhofdurchmesser sind rechts in den Abbildungen in Millimetern angegeben.

Ergänzend zu Toxinaufnahme und Sensitivität wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob es aufgrund der Deletion von *PBN1* zu Veränderungen in der Reifung oder Sekretion des K28-Toxins kommt, wenn der Toxinvorlufer *pptox* intrazellulär exprimiert wird. Dazu wurden sowohl die Mutante, als auch der Wildtyp mit dem Plasmid pPGK-M28-I transformiert, in dem die toxinkodierende Sequenz hinter dem konstitutiven *PGK*-Promotor vorliegt. Die Transformanten wurden in 15 ml *ura d/o* Glukose bei 20°C bis zur stationären Phase angezogen und der zellfreie Kulturüberstand mit Hilfe einer Vivaspin-Säule mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa auf ein Volumen von 200  $\mu$ l eingengt. Von diesem Konzentrat wurde jeweils ein Aliquot zur SDS-PAGE eingesetzt und im Agardiffusionstest gegen die sensitive Hefe 192.2d auf Aktivität getestet. Abbildung 46A zeigt den konzentrierten Kulturüberstand des Wildtyp-Stammes BJ5410 (Spur 2) sowie der Mutante  $\Delta pbn1$  (BJ10242; Spur 3). In beiden Spuren ließen sich auf der Höhe von etwa 11 kDa und 21 kDa jeweils zwei deutliche Toxinbanden nachweisen, deren Intensität in beiden Stämmen identisch war. Die Toxinsekretion war in Abwesenheit von *Pbn1p* folglich nicht beeinträchtigt.



**Abbildung 46: Nachweis der K28-Toxinsekretion im eingengten Kulturüberstand der  $\Delta pbn1$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp BJ5410.** Der Wildtyp-Stamm BJ5410 sowie die Deletionsmutante  $\Delta pbn1$  (BJ10242; *PBN1* unter *GAL*-Promotor) wurden mit dem Vorläufertoxin-Konstrukt pPGK-M28-I transformiert. Die Transformanten wurden in 15 ml ura d/o Glukose (zur Inhibierung der *Pbn1p*-Expression) 4 Tage bei 20°C und 60 Upm angezogen. Der zellfreie Kulturüberstand wurde mit Hilfe einer Vivaspin-Säule mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa auf ein Volumen von 200  $\mu$ l konzentriert.

(A) zeigt die Analyse des sezernierten Toxins im Western Blot. Dazu wurden 20  $\mu$ l des Kulturüberstandes mit 10  $\mu$ l reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel aufgetrennt. Der Blot wurde mit primärem anti- $\beta$ -Antikörper (1:500) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-„Rabbit“-Antikörper (1:5000) colorimetrisch entwickelt.

**Auftragschema:**

Spur 1: Protein-Standard (PageRuler Prestained, Fermentas)

Spur 2: Konzentrierter ÜS von BJ5410-pPGK-M28-I, 30  $\mu$ l

Spur 3: Konzentrierter ÜS von  $\Delta pbn1$ -pPGK-M28-I, 30  $\mu$ l

(B) 100  $\mu$ l jedes Konzentrates wurden im Agardiffusionstest (pH 4,7) gegen  $1 \times 10^6$  Zellen der sensitiven Hefe 192.2d getestet. Nach dreitägiger Inkubation bei 20°C wurde der Durchmesser der zellfreien Hemmhöfe als Maß für die Killeraktivität gemessen.

Mit Hilfe eines Agardiffusionstests wurde das sezernierte K28-Toxin auf Aktivität getestet. Auch hier zeigte sich keine Differenz im gebildeten Hemmhofdurchmesser (Abbildung 46B). Eine intrazelluläre Expression des K28-Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  war leider nicht möglich, da keine BJ10242-Transformanten erhalten werden konnten.

Ein zweites ER-Membran-lokalisiertes Chaperon, das in dieser Arbeit getestet wurde, ist Shr3p. Shr3p besitzt eine zentrale Funktion bei der Biogenese von Aminosäurepermeasen (AAPs), die in Abwesenheit von Shr3p im ER akkumulieren. AAP-Aggregate werden in Abhängigkeit von Doa10p und Hrd1p degradiert (Kota *et al.*, 2007). Weder die *SHR3*-Mutante *shr3Δ6*, noch die getesteten Doppelmutanten *pep4Δshr3Δ6* oder *shr3Δ6 doa10Δ* zeigten nach *in vivo* Expression von SS-pro- $\alpha^R$  einen Sensitivitätsverlust (Ergebnisse nicht dargestellt). In Tabelle 12 sind alle Ergebnisse der in dieser Arbeit getesteten Chaperon-Mutanten zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 12: Überblick der in dieser Arbeit getesteten Chaperon-Mutanten und ihre Beteiligung an der Cytotoxizität von K28 $\alpha$ .**

letal:	Wildtypsensitivität (Selbstkillerphänotyp)
(+):	geringfügig verminderte Sensitivität, Wachstum bis zur zweiten Verdünnungsstufe
+	verminderte Sensitivität, Wachstum bis zur dritten Verdünnungsstufe
++	Resistenz, Wachstum mindestens bis zur vierten Verdünnungsstufe
kA	keine Aussage möglich

	ER-luminale Chaperone		Cytosolische Chaperone	
<b>Hsp70 Chaperone</b>	<i>kar2-1, kar2-133</i>	kA	<i>Δssa1</i>	letal
			<i>Δssa3</i>	(+)
			<i>Δssb1</i>	+
<b>Hsp40</b>	<i>Δscj1Δjem1</i>	letal	<i>Δydj1</i>	++
<b>Co-Chaperone</b>			<i>Δhlj1</i>	(+)
<b>NEF</b>	<i>Δlhs1</i>	letal		
<b>Lectin-ähnliche Chaperone</b>	<i>Δcne1</i>	++		
<b>weitere Chaperone</b>	<i>Δpbn1</i>	letal <sup>○</sup>	<i>Δhsp26</i>	+
	<i>shr3Δ6</i>	letal		
	<i>pep4Δshr3Δ6</i>	letal		
	<i>shr3Δ6 doa10Δ</i>	letal		

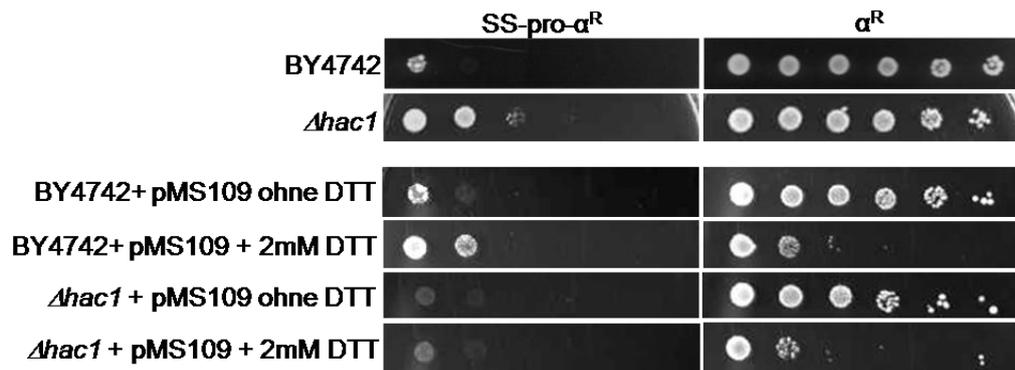
\* Hsp26p ist nach K28-Toxinbehandlung hochreguliert

<sup>○</sup>im Agardiffusionstest

## 7 Bedeutung der UPR für die Toxizität von K28 $\alpha$

Die Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen führt zu ER-Stress und aktiviert die „Unfolded Protein Response“ (UPR). Die UPR wiederum reguliert die Genexpression einer Vielzahl von Faltungsmediatoren (z.B. *KAR2*, *PDI1*, *LHS1*, *ERO1*), von Proteinen der Phospholipidbiosynthese und des Vesikeltransportes. UPR und ERAD dienen der Eliminierung fehlgefalteter Proteine und sind eng synchronisiert. So erfordert eine effiziente ER-assoziierte Degradation eine intakte UPR. Gleichzeitig erhöht das Anschalten der UPR die ERAD-Kapazität. So werden neben ER-Chaperon-kodierenden Sequenzen auch Gene hochreguliert, deren Produkte am ERAD beteiligt sind (*DER1*, *HRD1*, *HRD3* und *UBC7*) (Travers *et al.*, 2000). Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER wird von einer Transmembran-Proteinkinase, Ire1p, erkannt (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993; Shamu und Walter, 1996), die ein Signal zum Zellkern übermittelt. Durch Oligomerisierung und Autophosphorylierung von Ire1p wird dessen cytosolische Endoribonuklease-Domäne aktiviert und entfernt ein Intron der ungespleißten *HAC1*-mRNA (Welihinda und Kaufman, 1996; Sidrauski und Walter, 1997; Cox und Walter, 1996). Ausgehend von der gespleißten *HAC1*-mRNA wird Hac1p gebildet, ein bZIP-Transkriptionsfaktor. Hac1p aktiviert schließlich die Transkription seiner Zielgene, um der Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER entgegenzuwirken (Chapman *et al.*, 1998). Um zu testen, welchen Einfluss die UPR auf die K28-Toxizität hat, wurde eine  $\Delta hac1$ -Nullmutante mit dem Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  transformiert und das Wachstum der Transformanten nach Induktion der Expression auf ura d/o Galaktose-Agar mit dem Selbstkillerphänotyp des Wildtyps verglichen. In Abwesenheit von Hac1p ließ sich selbst bei der vierten Verdünnungsstufe noch schwaches Wachstum beobachten, was auf einer stark verminderten Toxizität von K28 $\alpha$  in Abwesenheit der UPR beruht (vgl. Abbildung 47). Zusätzlich wurden  $\Delta hac1$ /SS-pro- $\alpha^R$ -wie auch BY4742/SS-pro- $\alpha^R$ -Transformanten mit einem Plasmid (pMS109)

cotransformiert, das bereits die gespleißte 1,2 kb große Variante der *HAC1*-mRNA enthält. Die Expression von Hac1p ausgehend von dieser prozessierten *HAC1*-mRNA führte in einer  $\Delta hac1$ -Mutante zur Wiederherstellung des wildtypischen Selbstkillerphänotyps. Im Wildtyp BY4742 zeigte sich wie erwartet keine Sensitivitätsänderung (siehe Abbildung 47).



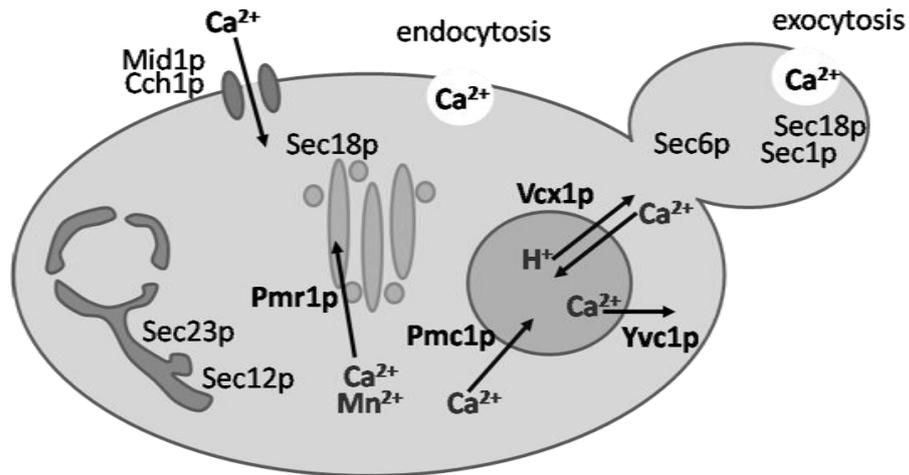
**Abbildung 47: Wachstumstest zur Untersuchung des Einflusses der UPR auf die Toxizität von K28 $\alpha$ .** Eine  $\Delta hac1$ -Nullmutante sowie der isogene Wildtyp BY4742 wurden mit dem K28-Letalkonstrukt pYES2.1/SS-pro- $\alpha^R$  und der nicht toxischen Variante pYES2.1/ $\alpha^R$  transformiert. Zusätzlich erfolgte eine Kotransformation mit dem Plasmid pMS109, welches die gespleißte Variante der *HAC1*-mRNA kodiert. Die Transformanten wurden in ura (bzw. ura leu) d/o Raffinose angezogen,  $10^7$  Zellen geerntet und eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt. Das Wachstum der Zellen unter induzierten Bedingungen wurde mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen. Zur Induktion der UPR wurden den Agarplatten 2 mM DTT zugesetzt (Anmerkung: DTT wirkte bereits auf die Kontrollzellen mit  $\alpha^R$  toxisch, daher konnten die betreffenden Tests nicht ausgewertet werden).

Ferner sollte untersucht werden, welchen Effekt die Induktion einer UPR auf die K28 $\alpha$ -Aktivität hat. Dazu wurde den Agarplatten 2 mM DTT zugesetzt, ein Detergens, das die Bildung von Disulfidbrücken verhindert. Infolge der DTT-Zugabe zeigten jedoch auch Transformanten, die mit der nicht toxischen K28 $\alpha$ -Variante transformiert waren, einen schweren Wachstumsdefekt, so dass eine Auswertung nicht möglich war. Da das K28-Heterodimer teilweise durch die Proteindisulfidisomerase Pdi1p entfaltet werden muss, um ins Cytosol zu gelangen (Heiligenstein, 2008), ist es wahrscheinlich, dass eine UPR-Aktivierung stattfindet. Um zu testen, auf welche Weise K28 mit der UPR in Verbindung steht, müsste die mRNA toxinbehandelter

Zellen im Northern Blot auf Hochregulation von UPR-Markern wie *HAC1*, *IRE1*, *KAR2* oder *PDI1* untersucht werden. Aus Zeitgründen konnte das betreffende Experiment nicht erfolgreich durchgeführt werden.

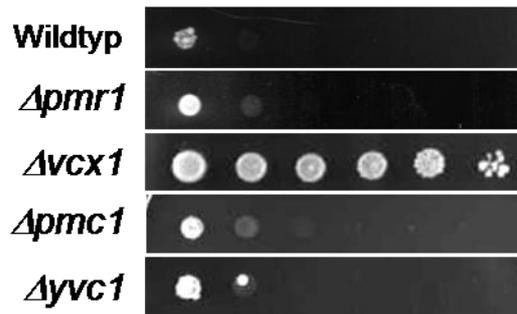
## 8 Einfluss der $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase

Calcium-Ionen sind in allen eukaryotischen Zellen wichtige „second messenger“ bei der Transduktion biologischer Signale. Durch Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalwege antworten eukaryotische Zellen auf Umweltstress wie Veränderungen in Temperatur, pH, Osmolarität oder Nährstoffverfügbarkeit. In Hefe stellt die Vakuole den Hauptspeicher für intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  dar und spielt eine essenzielle Rolle in der Erhaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionengleichgewichtes. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Vakuole erreicht 1,3 mM im Vergleich zu gerade einmal 10  $\mu\text{M}$  im ER (Halachmi und Eilam, 1989). Zur Veranschaulichung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Transports in *S. cerevisiae* sind die relevanten Transportproteine in Abbildung 48 schematisch dargestellt. Untersuchungen von Heiligenstein belegen, dass die Aufrechterhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Hefe-Sekretionsweg für die K28-Toxizität elementar ist. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Golgi und ER wird durch die P-Typ ATPase Pmr1p kontrolliert, die aktiv  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol in den Golgi-Apparat pumpt, um deren Konzentration im Sekretionsweg konstant zu halten. Eine Mutante mit einem Defekt in Pmr1p besitzt eine um 50% verringerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER (Strayle *et al.*, 1999) und zeigt sich darüberhinaus toxinresistent gegen exogenes K28 (Heiligenstein, 2008). Nach Expression von K28 $\alpha$  im ER einer  $\Delta\text{pmr1}$ -Mutante zeigte sich kein signifikanter Sensitivitätsverlust. Lediglich bei der zweiten Verdünnung konnte noch Zellwachstum beobachtet werden (vgl. Abbildung 48).



**Abbildung 48: Schematische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenverkehrs in der Hefe *S. cerevisiae* (verändert nach Kraus, S.).**

Neben der P-Typ ATPase Pmr1p wurden die drei vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter Vcx1p, Pmc1p und Yvc1p auf ihre Bedeutung für die K28-Toxizität getestet. Bei Vcx1p handelt es sich um einen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter mit niedriger Affinität, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sehr schnell in die Vakuole transportiert. Pmc1p hingegen ist eine hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die für die Erhaltung des niedrigen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels verantwortlich ist (Cunningham und Fink, 1994, 1996; Pozos *et al.*, 1996; Miseta *et al.*, 1999). Interessanterweise bildete sich bei Deletion von *VCX1* nach der intrazellulären Expression eines letalen K28 $\alpha$ -Derivates eine vollständige Resistenz aus, die im Vergleich zu allen bisher analysierten Mutanten den stärksten Phänotyp überhaupt zeigte (siehe Abbildung 49). Die Deletion des zweiten vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporters Pmc1p, dessen Aufgabe der Ionentransport in die Vakuole ist, wurde ebenfalls gegen intrazelluläres K28- $\alpha$  getestet. Auch der Verlust von *PMC1* führte zu einer verminderten Toxinsensitivität, der Effekt war allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt. Vor wenigen Jahren wurde ein weiterer vakuolärer Ionenkanal beschrieben, der die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Vakuole bewirkt: ein TRP-Kanal-Homolog, Yvc1p (Denis und Cyert, 2002). Wie  $\Delta pmr1$  hatte auch die Deletion von *YVC1* keinen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität von SS-pro- $\alpha^R$ ; eine betreffende Mutante zeigte einen Selbstkillerphänotyp, der kaum vom Wildtyp abwich (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Untersuchung von Mutanten mit Defekt in zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern auf Sensitivitätsänderung gegenüber der Expression eines K28-Letalkonstruktes.** Mutanten mit Defekt in verschiedenen zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern wurden mit dem Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  transformiert. Nach der Expression von K28 $\alpha$  wurde die Sensitivität der Mutanten im Wachstumstest analysiert und mit der des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen.

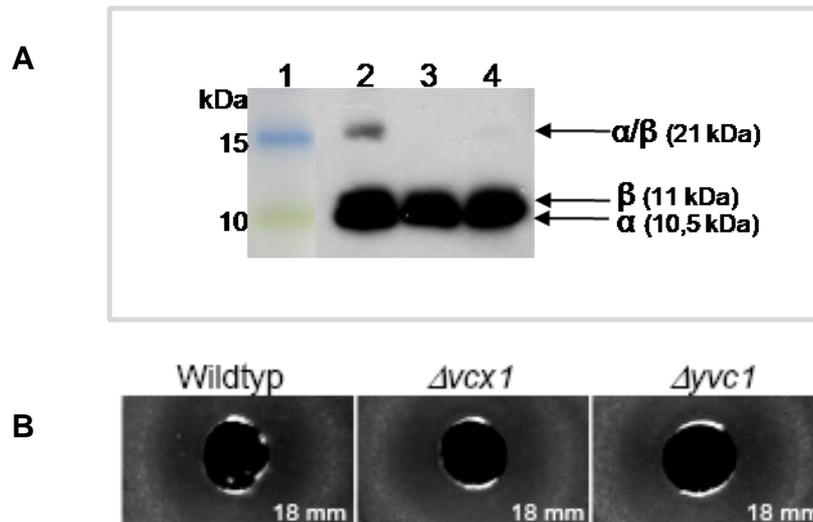
Um zu testen, ob der Sekretionsweg in Abwesenheit von *VCX1* oder *YVC1* gestört ist und infolgedessen die Toxinaufnahme oder der retrograde Transport von K28 ins Cytosol beeinträchtigt sind, wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen der Mutanten und des Wildtyps in 7,5 ml Methylenblauagar eingebettet und im Agardiffusionstest gegen K28-Toxinkonzentrat getestet. Nach dreitägiger Inkubation der Platten bei 20°C bildeten sich jeweils Hemmhöfe mit einem Durchmesser von 12 mm im Vergleich zu 11 mm beim Wildtyp BY4742. Somit verhielten sich die Deletionsmutanten sensitiv wie der Wildtyp (vgl. Abbildung 50).



**Abbildung 50: Agardiffusionstest zum Nachweis einer K28-Sensitivität der Deletionsmutanten  $\Delta vcx1$  und  $\Delta yvc1$  gegen exogenes Toxin.** Die Sensitivität von Wildtyp (BY4742) und Mutanten wurde im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen K28-Toxinkonzentrat bestimmt. Dazu wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen eingebettet und die Agarplatten nach Toxinzugabe drei Tage bei 20°C inkubiert. Als Maß für die Sensitivität ist der Durchmesser der zellfreien Hemmhöfe in Millimetern angegeben.

Ferner sollte untersucht werden, ob sich eine Deletion von *VCX1* bzw. *YVC1* negativ auf den Sekretionsweg auswirkt und ob infolgedessen die Sekretion oder Reifung des nativen K28-Toxins in solchen Mutanten beeinträchtigt sind. Dazu wurden beide Stämme ( $\Delta vcx1$  und  $\Delta yvc1$ ) sowie deren Wildtyp BY4742 mit dem Plasmid pYES2.1/pptox transformiert, welches die kodierende Sequenz für den K28-Toxinvorläufer unter der Transkriptionskontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors enthält. Die Transformanten jedes Stammes wurden in einer 50 ml Hauptkultur in *ura* d/o Galaktose-Medium fünf Tage bei 20°C und 65 Upm angezogen, um eine maximale Stabilität des sezernierten K28-Toxins zu gewährleisten. Der Kulturüberstand von je  $2,5 \times 10^9$  Zellen wurde sterilfiltriert und anschließend über eine Vivaspin-Säule mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa 100-fach eingengt. Je 20  $\mu$ l jedes Konzentrates wurden mit 10  $\mu$ l SDS-Probenpuffer (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt, nach Hitze-denaturierung in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Entwickelt wurde der Blot mit anti-K28-Antikörper und sekundärem HRP-gekoppeltem anti-„Rabbit“-Antikörper auf einem Lumifilm. Die von den beiden Mutanten  $\Delta vcx1$  und  $\Delta yvc1$  sezernierte Toxinmenge (Spuren 3 und 4; Abbildung 51A) entsprach im Wesentlichen der Wildtyp-Toxinsekretion (Spur 2). Bei genauer Betrachtung erscheint die Bande von  $\Delta vcx1$  etwas schwächer.

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob das sezernierte Toxin seine native Konformation besitzt. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen des sensitiven Hefestammes *S. cerevisiae* 192.2d in 7,5 ml Methylenblauagar (pH 4,7) eingebettet. In ein ausgestanztes Loch wurden 100  $\mu$ l des jeweiligen Toxinkonzentrates pipettiert und die Hefe drei Tage bei 20°C bebrütet. Der Durchmesser der entstandenen zellfreien Hemmzonen war mit 18 mm bei den Mutanten als auch im Wildtyp identisch (Abbildung 51B). Folglich schienen weder der Sekretionsweg noch die Reifung des K28-Toxins nach Deletion von *VCX1* oder *YVC1* gestört zu sein.



**Abbildung 51: Nachweis der K28-Toxinsekretion im eingengten Kulturüberstand der Nullmutanten  $\Delta vcx1$  und  $\Delta yvc1$  im Vergleich zum Wildtyp BY4742.** Der Wildtyp-Stamm BY4742 sowie die beiden Deletionsmutanten  $\Delta vcx1$  und  $\Delta yvc1$  wurden mit dem Vorläufertoxin-Konstrukt pYES2.1/pptox transformiert. Die Transformanten wurden in 50 ml ura d/o Galaktose 5 Tage bei 20°C und 65 Upm angezogen. Der zellfreie Kulturüberstand wurde mit Hilfe einer Vivaspin-Säule mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa 100-fach konzentriert.

**(A)** Das sezernierte Toxin wurde im Western Blot analysiert. Dazu wurden 20  $\mu$ l dieses Überstandes mit 10  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 10%-igen Tris/Tricin-Gel aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde auf eine PVDF-Membran gebロットet und die Proteine im Western Blot mit primärem anti-K28-Antikörper und sekundärem HRP-gekoppeltem anti-„Rabbit“-Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

**Auftragschema:**

Spur 1: Protein-Standard (PageRuler Prestained, Fermentas)

Spur 2: Konzentrierter ÜS von BY4742-pYES2.1/pptox, 30  $\mu$ l

Spur 3: Konzentrierter ÜS von  $\Delta vcx1$ -pYES2.1/pptox, 30  $\mu$ l

Spur 4: Konzentrierter ÜS von  $\Delta yvc1$ -pYES2.1/pptox, 30  $\mu$ l

**(B)** Zum Aktivitätsnachweis des K28-Toxins nach Produktion im Wildtyp bzw. in den Deletionsmutanten  $\Delta vcx1$  und  $\Delta yvc1$  wurden 100  $\mu$ l jedes Konzentrates im Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) gegen  $5 \times 10^5$  Zellen der sensitiven Hefe 192.2d getestet. Nach dreitägiger Inkubation bei 20°C wurde der Durchmesser der zellfreien Hemmhöfe als Maß für Killeraktivität gemessen.

## 9 Proteom-Analyse sensitiver Hefen nach K28-Behandlung

In einem zweiten, separaten Teil dieser Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit der AG Müller (Pharmazeutische Biotechnologie) eine Proteom-Analyse einer sensitiven Hefe nach Toxin-Behandlung durchgeführt werden. Ziel war es, durch die Identifizierung von Proteinen, die als Antwort auf K28-Behandlung ein verändertes Expressionsmuster aufweisen, weitere Einblicke in den intrazellulären Transport oder Wirkmechanismus des K28-Toxins zu erhalten.

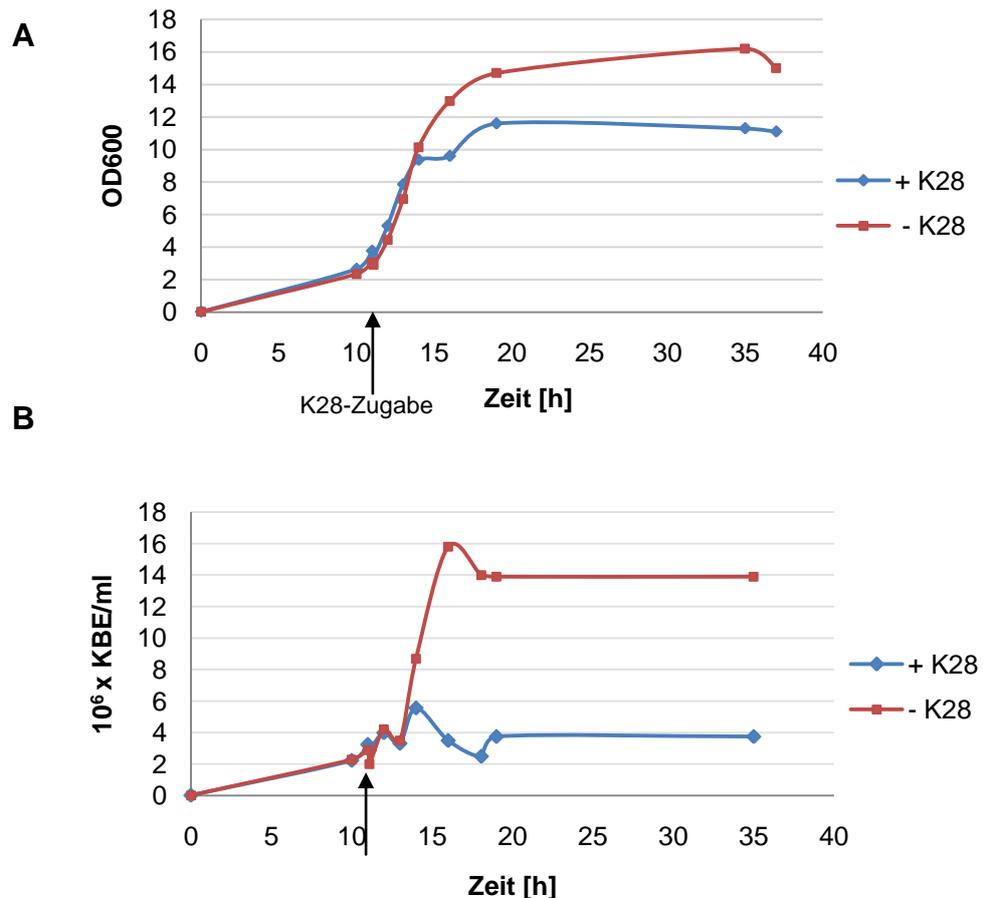
### 9.1 Vorversuche zur Abtötung einer sensitiven Hefe

Verschiedene Vorversuche adressierten die Definition geeigneter Versuchsbedingungen für die Proteomanalyse. Zunächst musste ein passender sensitiver Hefestamm gefunden werden. Mit Hilfe von Agardiffusionstests wurde aus etwa 50 *S. cerevisiae* Wildtyp-Stämmen der sensitivste Stamm identifiziert, der nicht zur Bildung von Zellaggregaten neigt (Ergebnis nicht dargestellt). Darüberhinaus galt es, die optimale Zusammensetzung des Mediums zu bestimmen, die eine maximale Abtötung ermöglicht. Getestet wurden vier verschiedene Medien (pH 4,7), zwei Voll-Medien (YEPD) sowie zwei synthetische (B-) Medien, mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen an Citrat und  $\text{CaCl}_2$ . Jeweils 3 ml des betreffenden Mediums wurden mit  $5 \times 10^5$  Zellen einer frischen ü.N.-Kultur beimpft und nach Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  K28-Toxinkonzentrat bzw. McIlvaine-Puffer (pH 4,7) 18 h und 42 h bei 20°C inkubiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) wurden anschließend 100  $\mu\text{l}$  einer 1:100-Verdünnung auf YEPD-Agar ausplattiert und die Platten bei 30°C bebrütet. Von diesen erwies sich mit einer Abtötung von 97% YEPD-Medium mit Zusatz von 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0,01 M Citrat (YPCCa) als geeignetes Medium.

## 9.2 Abtötungskinetik von *S. cerevisiae* TM230

Anhand einer Abtötungskinetik sollte schließlich der Zeitpunkt nach der Toxinzugabe bestimmt werden, an dem der toxische Effekt von K28 zum Tragen kommt. Es ist zu erwarten, dass an diesem Zeitpunkt eine spezifische Zellantwort stattfindet, die sich in einem veränderten Expressionsmuster zellulärer Proteine äußert. Eine Hauptkultur aus 50 ml YPCCa wurde mit 20 µl einer frischen ü.N.-Kultur von TM230 beimpft und bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Von dieser Hauptkultur wurden  $2,5 \times 10^7$  Zellen geerntet und in 20 ml YPCCa (pH 4,7) resuspendiert. Das Zellwachstum wurde über einen Zeitraum von 35 h durch Messung der optischen Dichte  $OD_{600}$  verfolgt. Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600}=3$  erfolgte die Zugabe von 5 ml K28-Toxinkonzentrat bzw. hitzeinaktiviertem Toxin. Parallel wurde die Lebendzellzahl (LZZ) bestimmt, indem zu jedem Zeitpunkt drei verschiedene Verdünnungsstufen auf YEPD-Agar ausplattiert und die entstandenen Kolonien nach Bebrütung der Platten bei 30°C ausgezählt wurden. Alle Werte sind in Abbildung 52 (A und B) grafisch dargestellt. Das hier verwendete Toxinkonzentrat bewirkte keine vollständige Abtötung der Zellen, sondern führte lediglich zu einer Wachstumsinhibierung, da keine Sphäroplasten, sondern Zellen mit intakter Zellwand zur Toxinbehandlung eingesetzt wurden. Bereits zwei Stunden nach Toxinapplikation war eine Wachstumshemmung durch langsameren Anstieg der  $OD_{600}$  erkennbar (Abbildung 52A).

Auch die Lebendzellzahl (KBE/ml) sank nach etwa zwei Stunden (Abbildung 52B). Da es hier nicht möglich war, den genauen Zeitpunkt nach K28-Behandlung festzustellen, an dem eine maximale Zellantwort erfolgte (d.h. Hoch-/Herunterregulation verschiedener Proteine als Antwort auf K28), sollte ein Zeitpunkt ausgewählt werden, an dem ein deutlich toxischer Effekt sichtbar wird, jedoch noch nicht seinen Höhepunkt erreicht hat. Etwa fünf Stunden nach Zugabe des Toxinkonzentrates zeigten beide Werte einen deutlich erkennbaren Unterschied zwischen der K28-behandelten und der Kontrollprobe.



**Abbildung 52: Abtötungskinetik der sensitiven Hefe *S. cerevisiae* TM230 nach Behandlung mit K28-Toxin.** 50 ml YPCCa wurden mit 20  $\mu$ l einer frischen  $\ddot{u}$ .N.-Kultur von TM230 beimpft und bei 30°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Von dieser Hauptkultur wurden  $2,5 \times 10^7$  Zellen geerntet und in 20 ml YPCCa (pH 4,7) resuspendiert. Über einen Zeitraum von 35 h wurden parallel die optische Dichte OD<sub>600</sub> (A) und Lebendzellzahl (KBE/ml) (B) bestimmt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 3 erfolgte die Zugabe von 5 ml K28-Toxinkonzentrat (entspricht 20%) bzw. hitzeinaktiviertem Toxin. Die Werte sind in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (KBE: Kolonie bildende Einheiten).

Danach pendelten sich sowohl die optische Dichte als auch die LZZ auf einem konstanten Level ein. Für die folgende Proteomanalyse wurden schließlich 350 ml YPCCa mit 200  $\mu$ l TM230 beimpft. Sobald die Zellen die frühe exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurden in acht parallelen Ansätzen je  $4 \times 10^7$  Zellen geerntet und in jeweils 40 ml YPCCa-Medium resuspendiert. Bei einer optischen Dichte von 3 erfolgte die Zugabe von 10 ml aktivem K28-Toxin bzw. inaktivem Toxin zu jeweils vier der Ansätze. Ausgehend von obiger Messung wurden die Hefen 5 h nach K28-Zugabe geerntet und mittels Glasperlen in 2 ml

DIGE-Lysepuffer (mit 2 µl Pharmalyte und 20 mg DTT) aufgeschlossen. Die Proteine des Zellysates wurden anschließend ü.N. mit Aceton/Methanol gefällt und das Proteinpellet in 400 µl DIGE-Puffer resuspendiert. Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde der pH-Wert der Proteinlösung mit KOH auf einen Wert von 8,5 eingestellt. Alle acht Proben wurden mit DIGE-„Labelling“-Puffer auf 10 mg/ml verdünnt.

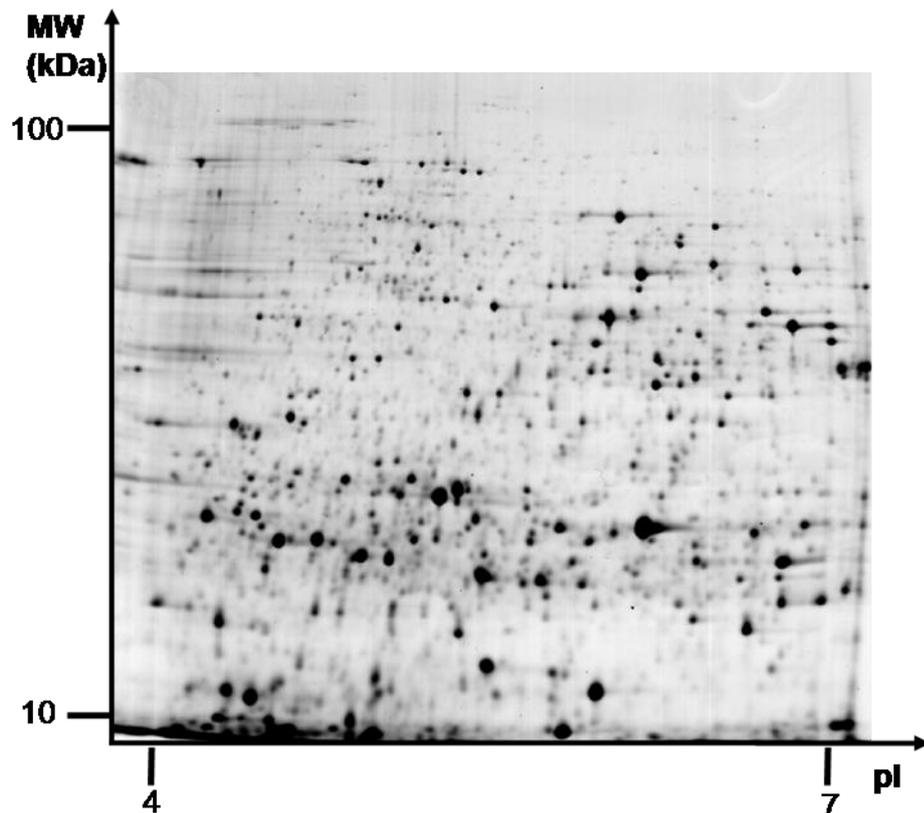
### **9.3 Test-Gele zur Optimierung der Proteinauftrennung**

Zu Beginn musste das Protokoll an die Proben angepasst werden, um eine optimale Auflösung der Protein-„Spots“ mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (genaue Durchführung siehe unter Punkt 4.7, Material und Methoden) zu erreichen. Um möglichst alle Proteine zu berücksichtigen, wurde mit einem immobilisierten pH-Gradienten im Bereich von pH 3-11 begonnen. Je größer der pH-Bereich gewählt wird, umso schwieriger gestaltet sich im Allgemeinen die Durchführung. Die Auftrennung der Proteine zwischen pH 8 und 11 war zunächst unzureichend, konnte jedoch durch Erniedrigung der Spannung während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von 8000 auf 3500 V verbessert werden. Da sich allerdings zeigte, dass die meisten Proteine der Probe im Bereich zwischen pH 3 und 8 lokalisiert waren, wurden für die späteren Versuche IPG-Streifen mit einem Gradienten von pH 4-7 eingesetzt, der die Durchführung nach Standard-Protokollen erlaubte und eine sehr gute, reproduzierbare Auftrennung der „Spots“ lieferte (Ergebnis nicht dargestellt).

### **9.4 Auswertung der zweidimensionalen DIGE-Gele**

„Differential in gel analysis“ (DIGE) stellt eine abgewandelte Form der zweidimensionalen Gelelektrophorese dar, die die Auftrennung zweier Proben (hier: mit aktivem und inaktivem K28-Toxin behandelte Hefen) im selben Gel erlaubt. Die Proben wurden wie unter Punkt 4.8 (Material und Methoden) beschrieben vorbereitet und mit jeweils einem der Farbstoffe Cy3 oder Cy5 behandelt. Zu statistischen Zwecken

wurden vier Gele parallel gefahren, wobei pro Gel eine Probe (1-4) zusammen mit einer Kontrolle (1-4) und dem internen Standard aufgetrennt wurden. Die Gesamtproteinmenge pro Gel betrug 500 µg. Die Durchführung der IEF und SDS-PAGE erfolgte nach dem Protokoll unter Punkt 4.7 (Material und Methoden).



**Abbildung 53: 2D-Gel der cytosolischen Proteine von *S. cerevisiae* TM230.** Die horizontale Achse repräsentiert die erste Dimension. Die Proteine wurden in einem pH-Bereich von 4 bis 7 nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Entlang der Vertikalen wurden die Proteine in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei der Skalierung ist zu beachten, dass es sich lediglich um ungefähre Werte handelt und die Skala nicht linear ist. Bei diesem Gel handelt es sich um ein DIGE-Gel, das nachfolgend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurde.

Die DIGE-Gele wurden eingescannt und mit Hilfe der „DeCyder™ image analysis“ Software analysiert. Bei dieser Analyse werden zunächst alle „Spots“ von Probe und Kontrolle innerhalb eines Gels definiert und die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten bestimmt, bevor diese Protein-„Spots“ mit den entsprechenden „Spots“ in jedem der insgesamt zwölf Gele (Cy2, Cy3 und Cy5-Proben in jeweils vier

parallelen Gelen) abgeglichen wurden. Durch die Anwendung eines „Proteinfilters“ wurden dann solche Proteine gesucht, die im Vergleich zur Kontrolle eine mindestens um den Faktor 1,5 erhöhte oder verringerte Fluoreszenzintensität aufwiesen (vgl. Tabelle 13). Die DIGE-Gele wurden anschließend mit Coomassie gefärbt, um die interessanten Proteine aus dem Gel auszuschneiden und mittels MALDI zu identifizieren. Ein solches DIGE-Gel nach Coomassie-Färbung ist in Abbildung 53 dargestellt. Bei der Auswertung der DIGE-Gele konnten mit Hilfe des Proteinfilters 32 von 2293 Proteinen ausfindig gemacht werden, die nach Toxinbehandlung im Vergleich zur Negativkontrolle, d.h. nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Toxin, ein verändertes Expressionsmuster aufwiesen (Tabellen 14 und 15).

**Tabelle 13: Übersicht der Einstellungen des Proteinfilters.**

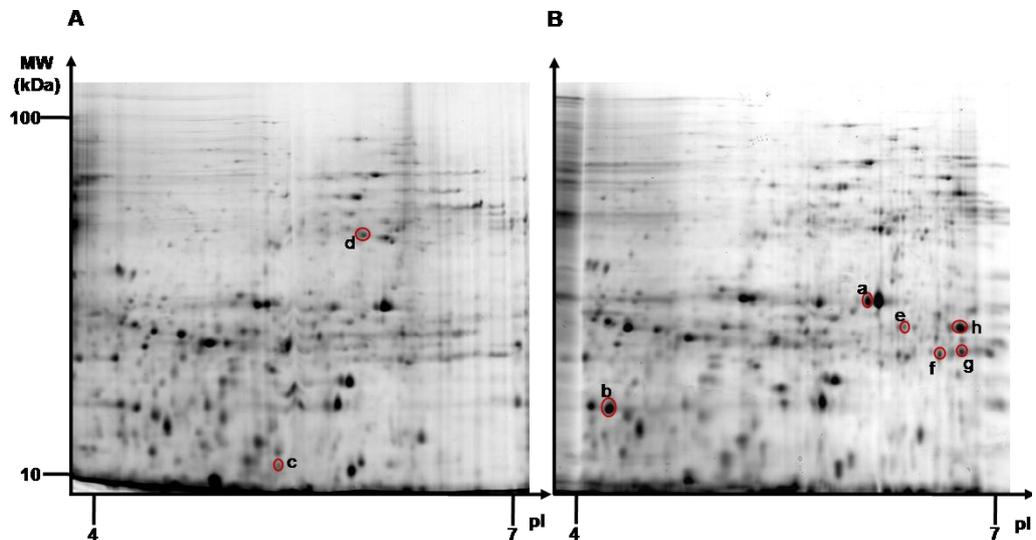
Allgemeine Filtereinstellungen	Proteine in allen 12 „Spot maps“ berücksichtigt	
Auswahl von Proteinen mit	T-Test	$\leq 0,05$
	Durchschnitts-Ratio	$\geq +1,5$
	Durchschnitts-Ratio	$\leq -1,5$
„gefilterte“ Proteine	<b>32</b> von insgesamt 2293	

### 9.5 Proteinidentifizierung mittels MALDI-ToF/ToF MS/MS und Datenbankabgleich

Die 32 „gefilterten“ Protein-„Spots“ wurden entweder mittels Ettan Spotpicker (Amersham Biosciences) oder mit Hilfe eines Skalpells aus den Gelen ausgeschnitten und in die Vertiefungen einer 96 „Well“-Platte überführt. Die Proben wurden anschließend wie unter Punkt 4.9 (Material und Methoden) beschrieben behandelt und durch „in-Gel“ Verdau mit „Sequencing Grade Modified Trypsin“ spezifisch fragmentiert. Zur massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-ToF MS/MS wurden jeweils 0,5  $\mu$ l der trypsinierten Proteinlösung auf einem staubfreien Probenhalter mit 0,5  $\mu$ l Matrixlösung vermischt. Als Matrix

diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (CCA). In Proben mit wenig Protein wurde das Mischungsverhältnis so variiert, dass zu 0,8  $\mu$ l Proteinlösung 0,4  $\mu$ l Matrix pipettiert wurden. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines „4800 MALDI ToF/ToF Analyzers“ der Firma Applied Biosystems mit einem Standard Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 355 nm. Als Standard für die Kalibrierung diente Angiotensin. Während der Messung wurden ausgehend vom MS-Spektrum die jeweils fünf stärksten „Precursor“ in einer kombinierten MS/MS weiter fragmentiert. Zur Identifizierung der gepickten Proteine wurden die gemessenen Spektren in die NCBI-Proteindatenbank eingegeben und mit theoretischen Spektren von Proteinen aus Hefe verglichen. Die identifizierten Proteine sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst. Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit konnten auf diese Weise vier Proteine identifiziert werden, die als Antwort auf eine K28-Behandlung in der sensitiven Hefe *S. cerevisiae* TM230 hochreguliert waren. Drei weitere Proteine waren mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 90% hochreguliert. Unter den Proteinen, deren Konzentration nach Toxinzugabe erhöht war, befindet sich Hsp26p, ein kleines cytosolisches Hitzeschockprotein, das als Antwort auf zellulären Stress hochreguliert wird und die Bildung von Proteinaggregaten verhindert (Haslbeck *et al.*, 2005). Weitere vier Proteine wurden als Antwort auf die Toxinbehandlung runter reguliert. Von den insgesamt elf, mittels MALDI-ToF/ToF und Datenbankabgleich, identifizierten Proteinen sind fünf im Kohlenhydrat-Metabolismus involviert und zwei weitere sind an der Zellzyklusprogression beteiligt. Es entpuppte sich als recht schwierig, alle 32 „Proteinspots“ in dem Coomassie-Gel wiederzufinden, da die Mehrheit der interessanten Proteine nur schwach exprimiert vorlag und nicht oder nur unzureichend gefärbt werden konnte. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Gele präpariert, in denen 600  $\mu$ g Protein aufgetrennt wurden, um die Intensität der zuvor kaum sichtbaren „Spots“ durch Coomassiefärbung zu erhöhen. Auf Gel A wurde eine Mischung der vier parallelen Kontrollansätze, die mit hitzeinaktiviertem

Toxin behandelt wurden, aufgetragen und auf Gel B eine entsprechende Mischung der Zellysate nach Inkubation mit dem aktiven K28-Toxin.



**Abbildung 54: Vergleich der 2D Gele der cytosolischen Proteine von *S. cerevisiae* TM230 nach Behandlung mit inaktiviertem (A) und aktivem (B) K28-Toxin.** Gel A stellt das Kontrollgel des Zellysates nach Behandlung mit hitzeinaktiviertem Toxin dar. Gel B zeigt die eigentliche Probe, das Zellysat fünf Stunden nach Behandlung mit aktivem K28-Toxin. Die horizontale Achse repräsentiert die erste Dimension. Die Proteine wurden in einem pH-Bereich von 4 bis 7 nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Entlang der Vertikalen wurden die Proteine in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei der Skalierung ist zu beachten, dass es sich lediglich um ungefähre Werte handelt und die Skala nicht linear ist. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Die Proteinauftrennung war in diesen Gelen, insbesondere im hochmolekularen Bereich, eher schlecht, so dass auch hier ein großer Teil der Proteine nicht zur MALDI-Analyse eingesetzt werden konnte (Abbildung 54). Die Auftrennung von Kontrolle und Probe in zwei unterschiedlichen Gelen erlaubte, die Intensität der „Spots“ auf „altmodische“ Weise mit bloßem Auge zu vergleichen. Auf diese Weise konnten acht weitere Proteine mit verändertem Expressionsmuster ausfindig gemacht werden, von denen die meisten nach Toxinbehandlung hochreguliert waren. Trotz Problemen beim Trypsinverdau und obwohl der Datenbankabgleich daraufhin nur vage Informationen („Proteinscore“ unter 40%) lieferte, konnten drei weitere Proteine identifiziert werden, deren vorhergesagter pI und Molekulargewicht mit den „Spots“ auf dem Gel übereinstimmte.

**Tabelle 14: Auflistung der nach K28-Behandlung der sensitiven Hefe *S. cerevisiae* TM230 hochregulierten Proteine.** Die Proteine 7 und 8 wurden nicht mittels DIGE, sondern durch Vergleich der „Spot“-Intensität von Kontroll- und Probengel identifiziert.

Nr	Protein	Protein Score %
1	Hsp26p kleines Hitzeschockprotein, cytosolisch	100
2	Tdh3p Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	>90
3	Eno1p Enolase	>90
4	Pdc1p Pyruvatdecarboxylase	>90
5	Adh1p Alkoholdehydrogenase	<90
6	Vma13p Untereinheit der V1-Domäne der V-ATPase	<40
7	Pho85p Cyclin-abhängige Kinase	<20

**Tabelle 15: Auflistung der nach K28-Behandlung der sensitiven Hefe *S. cerevisiae* TM230 herunterregulierten Proteine.** Rhb1p wurde erst durch Abgleich der „Spot“-Intensität der Coomassie-gefärbten Kontroll- und Probengele identifiziert.

Nr	Protein	Protein Score %
1	Eno2p Enolase	>90
2	Rad50p Untereinheit des XRS2-Komplexes	>90
3	Rhb1p putative Rheb-verwandte GTPase	<30

## IV Diskussion

Toxine spielen eine zentrale Rolle als Virulenzfaktoren pathogener Mikroorganismen. Viele bakterielle Toxine wirken im Zellinneren. Sie nutzen die bestehende Endozytosemaschinerie aus, um die Zielzelle rezeptorvermittelt zu internalisieren und retrograd in das Cytosol zu gelangen. Diese sogenannten (invasiven) A/B-Toxine bestehen aus einer A-Kette, deren enzymatische Aktivität spezifische Zielproteine modifiziert, und einer oder mehrerer B-Kette(n), die die Toxinbindung an die Zelloberfläche vermitteln und die A-Untereinheit an ihren intrazellulären Zielort transportieren. Die Produktion und Sekretion von Exotoxinen mit antimikrobieller Aktivität ist auch bei Hefen ein weit verbreitetes Phänomen (Polonelli, 1991; Bostian *et al.*, 1980). Während die meisten Hefe-Killertoxine auf Ebene der Plasmamembran wirken und eine Störung der Membranfunktion verursachen, wurden bislang vier invasive Killertoxine beschrieben, die in sensitiven Hefen derselben oder ähnlicher Gattungen einen Zellzyklusarrest induzieren. Zu diesen Toxinen zählt - neben Zymocin aus *Kluyveromyces lactis* und Killertoxinen aus *Pichia acaciae* und *Wingea robertsiae* - das in dieser Arbeit untersuchte Killertoxin K28 von *Saccharomyces cerevisiae* (Butler *et al.*, 1991; Magliani *et al.*, 1997; Mehlgarten und Schaffrath, 2003; Klassen *et al.*, 2004; McCracken *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1996). Dieses viral kodierte Toxin K28 gehört ebenfalls zur Familie der A/B-Toxine. Die Internalisierung erfolgt in zwei Schritten. Zuerst bindet die  $\beta$ -Untereinheit an ein  $\alpha$ -1,3-Mannoprotein der Zellwand der Zielzelle. Das Toxin wird anschließend in einem energieabhängigen Schritt zur Plasmamembran transloziert. Hier erfolgt die Wechselwirkung mit einem zweiten Rezeptor über das am  $\beta$ -C-Terminus lokalisierte ER-Retentionssignal HDEL (Pelham, 1990), das auch den retrograden Transport von K28 über den Golgi-Apparat bis in das ER der Zielzelle vermittelt. Alle bisherigen Daten deuten daraufhin, dass es sich bei diesem Rezeptor um den HDEL-Rezeptor Erd2p

handelt, der in geringer Kopienzahl auch in der Plasmamembran kolokalisiert (Sevrieva, 2009, Heiligenstein, 2008; Spindler, 2004; Eisfeld *et al.*, 2000, Riffer *et al.*, 2002). Verschiedene bakterielle A/B-Toxine, die ebenfalls mit Hilfe H/KDEL-ähnlicher Motive retrograd in das ER transportiert werden, scheinen sich als fehlgefaltete Proteine zu maskieren, um als ERAD-Substrat in das Cytosol transloziert zu werden (Hazes und Read, 1997; Lord, 1996; Simpson *et al.*, 1999). Wie genau K28 aus dem ER in das Cytosol gelangt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Anhand von Zellfraktionierungsexperimenten und Sensitivitätstests diverser Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Retrotranslokation des heterodimeren Toxins von der Funktion der Chaperone Kar2p, Cne1p und Pdi1p sowie der Co-Chaperone Scj1p und Jem1p abhängt und vermutlich durch den Translokationskomplex Sec61 erfolgt (Heiligenstein *et al.*, 2006; Eisfeld *et al.*, 2000). Bisherige Untersuchungen des K28-Dimers deuteten zudem daraufhin, dass die ER/Cytosol-Retrotranslokation unabhängig von Ubiquitinierung und klassischen ERAD-Komponenten abläuft, da lysinfreie Toxinvarianten im Cytosol toxinbehandelter Hefen nachweisbar waren und die Abwesenheit von Untereinheiten des HRD1- oder CDC48-Komplexes keinen Sensitivitätsverlust nach sich zogen (Heiligenstein, 2008; Heiligenstein *et al.*, 2006). Im Cytosol zerfällt das  $\alpha/\beta$ -heterodimere Toxin in seine beiden Untereinheiten. Nach Ubiquitinierung und proteasomaler Degradation der  $\beta$ -Untereinheit wird K28 $\alpha$  freigesetzt und gelangt vermutlich über passive Diffusion in den Zellkern, wo ein Arrest in der frühen S-Phase induziert wird (Schmitt *et al.*, 1989, 1996; Reiter *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit sollte die intrazelluläre Transportroute des K28-Toxins anhand verschiedener K28 $\alpha$ -Varianten und durch phänotypische Analyse ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten aufgeklärt werden. Besonderes Interesse galt dem Retrotranslokationsmechanismus von K28 $\alpha$ . In einem zweiten Projekt wurde das Proteom einer K28-behandelten Hefe analysiert, um durch die toxinspezifische Zellantwort neue Erkenntnisse über die intrazelluläre Route oder den Wirkmechanismus von K28 zu erhalten.

## **Aufklärung des intrazellulären Transportweges von K28 $\alpha$ und Nachweis möglicher posttranslationaler K28 $\alpha$ -Modifikationen**

Frühere Untersuchungen von Sendzig (2003) zeigten bereits, dass eine ER-luminale Variante der toxischen  $\alpha$ -Untereinheit mit N-terminaler Signalsequenz nach intrazellulärer Expression in einer K28-sensitiven Hefe zur Ausprägung eines Suizid-Phänotyps führt. Aus dieser Beobachtung und der Tatsache, dass ein solches K28-Derivat bisher nicht im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte, muss geschlossen werden, dass K28 $\alpha$  seiner Sekretion entgeht und einen Weg aus dem Sekretionsweg zurück in das Cytosol findet, um von dort seine toxische Aktivität in den Zellkern zu vermitteln. Die *in vivo* Expression eines K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes (SS-pro- $\alpha^R$ ) in verschiedenen Hefe-Deletionsmutanten stellt somit ein ausgezeichnetes Werkzeug dar, um die Toxin-Retrotranslokation aus dem Sekretionsweg in das Cytosol aufzuklären und am Transport beteiligte Komponenten zu identifizieren. Der Nachweis von SS-pro- $\alpha^R$  im Zelllysate einer Hefe gelang bisher nur durch „Epitop-Tagging“. In dieser Arbeit wurde dieses Derivat nach *in vivo* Expression zum ersten Mal in ungetaggter Form mit Hilfe radioaktiver Markierung detektiert. Der intrazelluläre Nachweis der cytosolischen Variante  $\alpha^R$  konnte auf diese Weise ebenfalls erbracht werden. Eine solche Toxinvariante erwies sich früher bereits als inaktiv, was in der vorliegenden Arbeit durch das Überleben einer mit  $\alpha^R$ -exprimierenden Wildtyp-Hefe bestätigt werden konnte. Die Expressionsstärke der  $\alpha$ -Untereinheit nach „Pulse-Labeling“ war mit derjenigen der ER-luminalen Variante SS-pro- $\alpha^R$  vergleichbar. Da  $\alpha^R$  demzufolge stabil im Cytoplasma Hefe vorliegt, wurde angenommen, dass der Eintritt von K28 $\alpha$  in den Sekretionsweg notwendig ist, um  $\alpha$  in eine toxische Konformation zu überführen. Dafür spricht auch, dass ein weiteres in dieser Arbeit hergestelltes K28 $\alpha$ -Derivat (SS- $\alpha^R$ ) mit Sekretionssignal trotz Abwesenheit der pro-Region einen Selbstkiller-Phänotyp hervorrief, während eine cytosolische Variante mit pro-Region

(pro- $\alpha^R$ ) keine Aktivität besaß. Die pro-Region, deren Funktion bislang noch ungeklärt ist, führte zwar zu einer geringen Aktivitätssteigerung, sie ist jedoch nicht ausreichend für die Toxizität. Für andere Proteinvorläufer wurde der pro-Region eine Chaperon-ähnliche Funktion oder eine Rolle als „Spacer“ zugesprochen, die entweder die korrekte Faltung des Proteins unterstützt oder die Erkennung der Signalsequenz beim ER-Import erleichtert (Lesage *et al.*, 2003; Jolliffe *et al.*, 2006). Ein fehlendes N-terminales Sekretionssignal hingegen hatte einen drastischen Einfluss auf die Toxizität, was zu der Annahme führte, dass K28 $\alpha$  erst innerhalb des Sekretionsweges seine toxische Konformation erhält. Neu synthetisierte Proteine unterliegen im Sekretionsweg einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen, die für die Proteinaktivität essenziell sind. Eisfeld konnte in ihrer Dissertation nachweisen, dass das Hsp70-Chaperon Kar2p im ER einer toxinproduzierenden Hefe für die korrekte Faltung von K28 zum biologisch aktiven Toxin essenziell ist. Im Vergleich zum Wildtyp war die K28-Sekretion einer *kar2-159* Mutante deutlich verringert. Mittels Zellfraktionierung konnte zudem belegt werden, dass die verminderte K28-Sekretion dieser Mutante nicht auf einem Defekt im ER-Import beruht, da der unprozessierte Toxinvorläufer im ER der *kar2*-Mutante akkumulierte (Eisfeld, 2001). Darüber hinaus kommt es im ER durch die Wirkung der Proteindisulfidisomerase Pdi1p zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>56</sup> in der  $\alpha$ -Untereinheit und dem unmittelbar am  $\beta$ -C-Terminus lokalisierten Cys<sup>340</sup> (Riffer *et al.*, 2002). Intramolekulare Disulfidbrücken innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit sind allerdings nicht möglich, da K28 $\alpha$  nur einen einzigen Cystein-Rest enthält; potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind ebenfalls lediglich in der  $\gamma$ -Sequenz des Protoxins vorhanden. Demzufolge bewirkten weder eine Endoglykosidase H-Behandlung, noch eine milde Alkali-Hydrolyse eine Größenänderung der Toxinbanden im Gel. Infolgedessen kann eine posttranslationale Modifikation von K28 durch N- oder O-Glykosylierung ausgeschlossen werden (Schmitt und Tipper, 1995). Schmitt und Tipper zeigten weiterhin, dass die Peptidase-Funktionen

zweier Golgi-lokalisierter Enzyme, Kex2p und Kex1p, essenziell für die Toxinaktivität des reifen K28-Dimers sind. Während die Carboxypeptidase Kex1p, welche die  $\alpha$ - und  $\beta$ -C-Termini kürzt, lediglich die Toxizität von K28 erhöht, ist die Aktivität von Kex2p absolut notwendig für die Sekretion des reifen Toxins. Kex1p katalysiert darüber hinaus die Prozessierung des  $\alpha$ -C-Terminus des strukturell mit K28 verwandten K1-Toxins und ist unentbehrlich für dessen Reifung (Zhu *et al.*, 1987). Im Zelllysate des *in vivo* translatierten, „pulse gelabelten“ K28-Derivates SS-pro- $\alpha^R$  wurden neben der 15 kDa-Bande zwei kleinere Banden beobachtet, die auf eine mögliche Prozessierung im ER (durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz) oder im Golgi hindeuten. Um Aussagen über eine Konformationsänderung von K28 $\alpha$  im ER machen zu können, war es unerlässlich, zunächst den ER-Import von SS-pro- $\alpha^R$  nachzuweisen. Die Hydrophobizität einer Signalsequenz entscheidet darüber, ob ein Protein co- oder posttranslational in das ER transloziert wird (Ng *et al.*, 1996). Durch Anwendung eines Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982) wurde ein Hydrophobizitäts-Plot erhalten, der auf einen posttranslationalen ER-Import von K28p<sub>tox</sub> schließen lässt (Eisfeld, 2001). In einem ersten Schritt des posttranslationalen Proteinimports wechselwirkt die hydrophobe Signalsequenz mit einem ER-Membran-Komplex bestehend aus dem heterotrimeren Sec61-Komplex, der den Transportkanal darstellt, und dem tetrameren Sec63-Komplex (bestehend aus Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p) (Lyman und Schekman, 1997; Plath *et al.*, 1998; Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995). Der Eintritt der Polypeptidkette in das Sec61-Translokon und der darauffolgende ER-Import sind abhängig von der ATPase Funktion des Hsp70 Chaperons Kar2p/BiP (Matlack *et al.*, 1999). Zum Nachweis des posttranslationalen ER-Imports von SS-pro- $\alpha^R$  wurden in dieser Arbeit zwei Mutanten mit Defekt in den beiden nicht-essenziellen Untereinheiten des Sec63-Komplexes getestet:  $\Delta sec71$  und  $\Delta sec72$ . Diese Deletionen verursachen die Akkumulation verschiedener Präproteine *in vivo* (Feldheim *et al.*, 1993; Kurihara und Silver, 1993).

Plath *et al.* (1998) zeigten, dass die Signalsequenz des ppaF eine Helix formt, die während des posttranslationalen ER-Imports mit Sec62p und Sec71p interagiert. Der C-terminale Teil des Signalpeptids bindet zusätzlich an Sec72p, das für die Signalpeptiderkennung bestimmter Signalsequenzen zuständig ist und die Transfereffizienz von Vorläuferproteinen zum Translokationssitus steigert (Plath *et al.*, 1998; Feldheim und Schekman, 1994). In Abwesenheit von *SEC72* verlor das K28-Letalkonstrukt deutlich an Toxizität, so dass entsprechende Transformanten die *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  im ER überlebten. Die  $\Delta$ *sec71*-Mutante zeigte einen etwas schwächeren Phänotyp. Da für beide Komponenten eine spezifische Rolle beim posttranslationalen ER-Import beschrieben ist, unterstützt die verminderte Sensitivität beider Mutanten die These dieses Importweges. Ferner wurden temperatursensitive *sec61*- und *kar2*-Mutanten auf Sensitivität gegen die intrazelluläre Expression des Letalkonstruktes untersucht. Entsprechende Wachstumstests waren jedoch nicht auswertbar, da selbst nach Transformation mit dem nicht-toxischen Kontrollkonstrukt ein starker Wachstumsdefekt der Mutanten zu beobachten war. Im Rahmen seiner Diplomarbeit gelang Nico Schäuble mit Hilfe des bimolekularen Fluoreszenzkomplementations-Assays der Nachweis, dass es *in vivo* zu einer direkten Interaktion zwischen Sec61p bzw. Kar2p und SS-pro- $\alpha^R$  kommt (Schäuble, 2008). Es war allerdings nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob diese Wechselwirkung während des ER-Imports und/oder während der ER/Cytosol-Dislokation von K28 $\alpha$  stattfindet. Am posttranslationalen ER-Import des ppaF in Hefe ist neben den cytosolischen Produkten der SSA-Genfamilie (Ssa1p und Ssa2p), die die ppaF-Translokationsrate um das Achtfache steigern (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988), auch Ydj1p beteiligt (Caplan *et al.*, 1992). Dieses cytosolische Hsp40 Co-Chaperon stimuliert die ATPase-Aktivität von Ssa1p (Cyr *et al.*, 1992). Während in Abwesenheit von Ssa1p und Ssa3p nur eine schwache Verminderung der K28 $\alpha$ -Aktivität zu beobachten war, bildete sich nach Deletion von *YDJ1* eine fast vollständige Resistenz aus. Auch die Abwesenheit von

Ssb1p sowie eines zweiten cytosolischen Co-Chaperones, Hlj1p, führte zu einer verminderten Sensitivität gegen SS-pro- $\alpha^R$ . Diese Ergebnisse bestätigen wiederum den posttranslationalen ER-Import des K28-Letalkonstruktes. Da die N-terminale Signalsequenz von K28pptoX im ER-Lumen durch den Signalpeptidasekomplex (SPC) proteolytisch entfernt wird (Schmitt und Tipper, 1995; Riffer *et al.*, 2002), wurde in dieser Arbeit der Einfluss der beiden nicht-essenziellen SPC-Untereinheiten Spc1p und Spc2p auf die K28 $\alpha$ -Toxizität untersucht. Entsprechende Deletionsmutanten zeigten nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes eine schwach verminderte Sensitivität, die auf einen ER-Import von SS-pro- $\alpha^R$  und die Abspaltung der Signalsequenz hindeutet. Durch Fluoreszenzrekonstitution des roten Fluorophors mCherry nach Koexpression von SS-MC-pro- $\alpha^R$  mit den mCherry-Spc-Fusionen Spc1-MN bzw. Spc2-MN (wobei MN für den N-terminalen Teil und MC für den C-terminalen Teil von mCherry steht) konnte eine *in vivo* Wechselwirkung zwischen Spc1p und Spc2p mit dem K28-Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  im ER-Lumen nachgewiesen werden (Schäuble, 2008). Aus der Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz resultiert ein Größenunterschied im SDS-Gel, der die Entstehung einer kleineren Bande nach der *in vivo* Translation von SS-pro- $\alpha^R$  erklärt. Erfährt das prozessierte Derivat pro- $\alpha^R$  im Sekretionsweg eine posttranslationale Modifikation, kommt es zu einer Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit. Durch eine solche Veränderung der Tertiärstruktur werden andere Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche exponiert, wodurch sich mit großer Wahrscheinlichkeit die Zugänglichkeit potenzieller Proteaseschnittstellen ändert. Durch unvollständigen Trypsinverdau einer cytosolischen und einer ER-luminalen K28 $\alpha$ -Variante sollten nur die leicht zugänglichen Erkennungssequenzen gespalten werden, so dass sich ein verändertes Bandenmuster ergäbe, falls sich beide Derivate in ihrer Konformation unterscheiden. Da sich der intrazelluläre Nachweis schwierig gestaltete und erst nach radioaktiver Markierung relativ schwache Banden nachweisbar waren, wurden V5-getaggte Derivate

eingesetzt, die sich im Western Blot einfach nachweisen lassen. Da dieses „Tag“ keine Trypsinschnittstellen enthält, sollten die meisten Fragmente nach Verdau entsprechender Zelllysate gut erkennbar sein. Tatsächlich ergab sich nach Trypsinbehandlung ein spezifisches Bandenmuster für die cytosolische Toxin-Variante, das sich eindeutig von dem der K28 $\alpha$ -Variante unterschied, die im Sekretionsweg exprimiert wurde. Später stellte sich allerdings heraus, dass ein Größenunterschied zwischen beiden unbehandelten Proben existiert, der auf eine Prozessierung der ER-luminalen Variante hindeutet. Demnach beruhten die Unterschiede im Schnittmuster wahrscheinlich auf der zusätzlichen pro-Region der cytosolischen Variante pro-V5- $\alpha^R$ , die eine Trypsinschnittstelle enthält und bei der ER-luminalen Variante fehlt. Diese zusätzliche Schnittstelle führt theoretisch zur Entstehung von 15 V5-haltigen Fragmenten im Größenbereich von 39 bis 127 kDa im Vergleich zu gerade einmal fünf Fragmenten (39-114 kDa) in V5- $\alpha^R$  (nach Abspaltung der Signalsequenz und der pro-Region). Da V5- $\alpha^R$  ohne pro-Region cytosolisch instabil war und daher im Zelllysate nicht nachgewiesen werden konnte, wurde das ER-luminale Toxin-Konstrukt SS-pro-V5- $\alpha^R$  in einer  $\Delta kex2$ -Mutante exprimiert, in der keine Abspaltung der pro-Region mehr erfolgen dürfte. Allerdings waren in der unbehandelten Probe zwei Banden detektierbar, die darauf hindeuteten, dass ein Teil dieses Konstruktes trotz der fehlenden Kex2p-Funktion prozessiert wurde. Da Yap3p, eine membranverankerte Aspartylprotease, bei Überexpression den Verlust der Kex2p-Aktivität teilweise supprimieren kann (Egel-Mitani *et al.*, 1990), wurde eine Doppelmutante  $\Delta kex2\Delta yap3$  mit dem Toxinderivat SS-pro-V5- $\alpha^R$  transformiert. Eine entsprechende Mutante wies jedoch so starke Wachstumsdefekte auf, dass K28 $\alpha$  im Zelllysate nicht nachgewiesen werden konnte. Somit gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht mittels Trypsinverdau eine mögliche Konformations-änderung von K28 $\alpha$  im Sekretionsweg nachzuweisen. Aus Zeitgründen war es nicht mehr möglich, einen Proteaseverdau mit einer hochspezifischen Chymotrypsin-Variante durchzuführen, die laut Vorhersage mittels

„Expasy PeptideCutter“ zwar innerhalb von  $\alpha$  schneidet, aber keine Schnittstellen in der pro-Region erkennt und daher für dieses Experiment optimal geeignet wäre. Proteine mit Sekretionssignal gelangen mit Hilfe COPII-bedeckter Vesikel zum Golgi-Apparat, wo im ER angeheftete N-Glykanketten modifiziert werden und weitere Prozessierungen stattfinden. Von dort aus erfolgt dann die Sortierung löslicher Proteine zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort in die Vakuole oder an die Plasmamembran beziehungsweise deren Sekretion in das Kulturmedium. Sendzig erhielt bereits durch Wachstumstests von COPII-Mutanten einen ersten, indirekten Hinweis auf einen ER-Golgi-Transport der  $\alpha$ -Untereinheit nach intrazellulärer Expression eines Letalkonstruktes mit Sekretionssignal (Sendzig, 2006). Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, wo die Bildung von COPII-Vesikeln nur an spezialisierten Bereichen des ER startet (Orci *et al.*, 1991) können sich COPII-Vesikel in *S. cerevisiae* von jeder Stelle der ER-Membran aus bilden (Sato und Nakano, 2007). Durch die Aktivierung der kleinen GTPase Sar1p durch den Guaninaustauschfaktor Sec12p wird die Assemblierung der COPII-Vesikelhülle an der ER-Membran initiiert (Nakano und Muramatsu, 1989; Barlowe und Schekman, 1993). Sar1-GTP rekrutiert dann das Sec23p/24p-Heterodimer zur ER-Membran. Es bildet sich ein sogenannter „Pre-budding“-Komplex, der zusammen mit einem Sec13p/31p-Heterotetramer die äußere Hülle der COPII-Vesikel bildet (Lederkremer *et al.*, 2001). Da die meisten Sec-Proteine essenziell und entsprechende „Knock-outs“ nicht lebensfähig sind, wurden nicht-essenzielle Komponenten getestet, die hauptsächlich an der Cargoselektion beteiligt sind. Einige lösliche Sekretionsproteine benötigen für die Verpackung in COPII-Vesikel spezifische Transmembranrezeptoren/-adaptoren, die über bestimmte Verpackungssignale in ihrer cytosolischen Domäne mit der COPII-Hülle interagieren (Appenzeller *et al.*, 1999). Emp24p dient beispielsweise als Adaptor für Gas1p und vermittelt dessen effizienten ER-Export (Munitz *et al.*, 2000). Erv41p und Erv46p, die zusammen in einem Komplex vorliegen und wie verschiedene Proteine der p24-Familie an der

Vesikelbildung, Verpackung der Cargos und/oder Membranfusion beteiligt sind, tragen dihydrophobe Signale, deren Mutation zur Akkumulation im ER führt (Belden und Barlowe, 1996; Dominguez *et al.*, 1998, Otte *et al.*, 2001; Otte und Barlowe, 2002). Im Gegensatz zu  $\Delta erv41$  und  $\Delta erv46$  Mutanten, die nach Expression von SS-pro- $\alpha^R$  im ER einen Selbstkillerphänotyp ausbildeten, zeigte sich eine Deletionsmutante in Abwesenheit von Em24p stark vermindert sensitiv. Der glykosylierte Vorläufer des  $\alpha$ -Faktor Pheromons (gp $\alpha$ F) und CPY benötigen für ihre Verpackung in COPII-Vesikel das Hefeprotein Erv29p (Belden und Barlowe, 2001). Die pro-Region von gp $\alpha$ F enthält hierzu ein Erv29p-Erkennungsmotiv bestehend aus den hydrophoben Resten ILV (Otte und Barlowe, 2004). K28 $\alpha$  besitzt ein ähnliches Motiv aus den hydrophoben Resten ILYVL an den Aminosäure-Positionen 30 bis 34, das an der dritten Position durch die polare Aminosäure Tyrosin unterbrochen wird. In einer  $\Delta erv29$ -Nullmutante zeigte das K28-Letalkonstrukt eine deutlich reduzierte Toxizität. Erv29p ist vermutlich an der Verpackung einer Reihe von „Cargoproteinen“ in COPII-Vesikel beteiligt und hat eine direkte Rolle als „Cargo“-Rezeptor (Caldwell *et al.*, 2001). Besonders interessant war der Phänotyp einer  $\Delta bst1$ -Deletionsmutante, die nach *in vivo* Expression von K28 $\alpha$  im ER eine starke Resistenz ausbildete. Bst1p ist, wie Erv29p, im Zuge der ER-assoziierten Degradation (ERAD) speziell für den Golgi-Transport fehlgefalteter Proteine zuständig (Vashist *et al.*, 2001; Caldwell *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um einen ER-Qualitätskontroll-Mechanismus, der von einigen invasiven A/B-Toxinen wie Ricin ausgenutzt wird, um in das Cytosol zu gelangen (Simpson *et al.*, 1999). Haynes und Mitarbeiter zeigten, dass Hefezellen bei ER-Stress in Abwesenheit von Erv29p ihre Fähigkeit verlieren, fehlgefaltete Proteine aus dem ER zu eliminieren (Haynes *et al.*, 2002; 2004). Bei fehlender Bst1p-Funktion werden die potenziellen, löslichen ERAD-Substrate KHN und CPY\* im ER zurückgehalten und stabilisiert, wohingegen andere Substrate wie das Membranprotein Ste6-166p normal degradiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass *bst*-Mutationen

zum Verlust ER-residenter Proteine wie Kar2p und Pdi1p führen. Übermäßige Sekretion von Kar2p ins Kulturmedium ist ein Phänotyp, der für *erd2*-Mutationen beschrieben ist und deutet auf einen Defekt im ER-Golgi-Recycling-Mechanismus hin (Elrod-Erickson und Kaiser, 1996; Hardwick *et al.*, 1990; Semenza *et al.*, 1990). Ferner wurde diesem Protein eine Schlüsselrolle bei der Degradation fehlgefalteter GPI-verankerter Proteine zugesprochen (Fujita *et al.*, 2006). Auch die Abwesenheit von Erv29p führt zur Stabilisierung fehlgefalteter löslicher Proteine wie CPY\* und PrA\* (Caldwell *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mutantentests lieferten nicht nur einen Hinweis auf den COPII-vermittelten ER-Golgi-Transport der  $\alpha$ -Untereinheit, sondern deuteten zudem daraufhin, dass sich K28 $\alpha$  als fehlgefaltetes Protein tarnt, um mit Hilfe des ERAD-Weges das Cytosol zu erreichen.

Der Toxinvorläufer unterliegt im späten *trans*-Golgi einer Prozessierung durch die Proteasen Kex2p und Kex1p, die für die Toxinaktivität von enormer Bedeutung sind (Schmitt und Tipper, 1995). Die Endoprotease Kex2p schneidet bevorzugt C-terminal der dibasischen Aminosäurepaare Lys-Arg oder Arg-Arg (Fuller *et al.*, 1989, Brenner und Fuller, 1992) mit einem hydrophoben Rest an Position P4 (Tao *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1994). Die von Riffer identifizierten Kex2p-Schnittstellen unterscheiden sich geringfügig von den „gewöhnlichen“ Motiven. Durch Prozessierung der Kex2-Schnittstelle Leu-Glu-Glu-Arg<sup>49</sup> wird beispielsweise die N-terminal von  $\alpha$  gelegene pro-Region entfernt (Riffer *et al.*, 2002). Falls K28 $\alpha$  bis in das späte Golgi transportiert wird, sollte es durch die Aktivität der Kex2p-Endoprotease zur Abspaltung der pro-Region kommen. Anhand V5-/FLAG-getaggtter K28 $\alpha$ -Derivate konnte im Zelllysate transformierter Hefen eine solche Prozessierung im Western Blot nachgewiesen werden. Nach Expression V5-getaggtter Varianten in *S. cerevisiae* war ein deutlicher Größenunterschied zwischen der cytosolisch exprimierten Variante pro-V5- $\alpha^R$  und der ER-luminalen Variante SS-pro- $\alpha^R$  zu erkennen. Das luminale Derivat wies hierbei mit 11-12 kDa ein kleineres Molekulargewicht auf, das der

erwarteten Größe nach Abspaltung der Signalsequenz und der pro-Region entsprach. Neben den V5-„getaggteten“ Varianten wurden zudem entsprechende Derivate mit FLAG-„Tag“ getestet. Als zusätzliches Kontrollkonstrukt diente eine ER-luminale Variante ohne pro-Region. Erwartungsgemäß zeigte dieses Konstrukt nach Eintritt in das ER und Abspaltung der Signalsequenz im Zellysat dieselbe Größe wie SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  nach erfolgter Kex2p-Prozessierung. In einem weiteren Konstrukt wurde die von Riffer beschriebene Kex2p-Schnittstelle in der pro-Region zerstört, indem der Argininrest an Position 49 durch ein Alanin ersetzt wurde. Nach *in vivo* Expression der resultierenden K28 $\alpha$ -Variante SS-pro-FLAG- $\alpha^R$   $\rightarrow$  A<sup>49</sup> war im Western Blot eine Bande bei etwa 15 kDa detektierbar, die auf eine fehlende Prozessierung im Golgi hindeutete. Zugleich zeigte sich eine weitere Bande auf Höhe der prozessierten Form. Dieselben beiden Banden waren nach Expression der luminalen Variante SS-pro-V5- $\alpha^R$  in einer  $\Delta$ kex2-Nullmutante zu beobachten. Demnach wurde selbst in der  $\Delta$ kex2-Mutante sowie nach Zerstörung der Kex2p-Schnittstelle ein Teil des Letalkonstruktes prozessiert. Diese Prozessierung ist vermutlich auf die Aktivität der Aspartylprotease Yap3p zurückzuführen, die teilweise redundante Funktion besitzt und primär C-terminal von Leu-Glu-Arg spaltet (Bourbonnais *et al.*, 1993). Einen gesicherten Beweis für die Abspaltung der pro-Region in SS-pro-FLAG- $\alpha^R$  lieferte ein Western Blot, der mit einem hochspezifischen M1-Antikörper entwickelt wurde. Im Gegensatz zu dem zuvor verwendeten M2-Antikörper bindet M1 das FLAG-„Tag“ nur dann, wenn dessen N-Terminus frei zugänglich ist. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte tatsächlich nur die ER-luminale Variante, nicht aber pro-FLAG- $\alpha^R$  nachgewiesen werden. Aus dieser Beobachtung muss abgeleitet werden, dass *in vivo* die pro-Region, die den N-Terminus von FLAG maskierte, abgespalten wurde. Alles deutet darauf hin, dass diese Prozessierung auf der proteolytischen Aktivität von Kex2p beruht. Gleichzeitig impliziert dieses Ergebnis, dass K28 $\alpha$  nach Eintritt in den Sekretionsweg ein spätes Golgi-Kompartiment erreicht. Anhand von Überlebenstests konnte weiterhin gezeigt werden,

dass ein im ER exprimiertes Letalkonstrukt deutlich an Toxizität verliert, wenn die Kex2p- oder Kex1p-Funktionen zerstört sind. In Abwesenheit von Kex2p bildete sich sogar eine vollständige Resistenz aus. Ebenso führte die Zerstörung der Kex2p-Schnittstelle innerhalb der pro-Region zu einem vollständigen Toxizitätsverlust des Letalkonstruktes. Somit konnte bewiesen werden, dass das Entfernen der pro-Region durch die Aktivität von Kex2p und eine Kex1p-Prozessierung für die Umwandlung von K28 $\alpha$  in die cytotoxische Konformation obligat sind, wobei der Kex2p-Funktion eine bedeutendere Rolle zukommt. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass K28 $\alpha$ -Derivate mit Signalsequenz oder Kernlokalisierungssignal und  $\alpha$ -C-terminalem Argininrest als potenzielle Kex1p-Schnittstelle die größte Toxizität besaßen (Sendzig, 2003; Reiter, 2004). Um die Rolle der Kex1p-Prozessierung und des  $\alpha$ -C-terminalen Arginins näher zu untersuchen, wurde diese Aminosäure deletiert bzw. durch andere Aminosäurereste ersetzt. Die entsprechenden Toxinderivate wurden im Wachstumstest auf ihre Toxizität untersucht. Lediglich eine Substitution durch einen positiv geladenen Rest wie Lysin oder Histidin führte zu einem geringen Toxizitätsverlust. Weder eine Deletion, noch ein Austausch durch Leucin oder Aspartat beeinflussten die Toxizität negativ. Leucin und Aspartat schienen eher einen noch toxischeren Phänotyp hervorzurufen. Die Carboxypeptidase-Aktivität von Kex1p ist spezifisch für basische Aminosäure-Reste. In Anwesenheit N-blockierter Peptide gelang Cooper und Bussey durch den Einsatz von BPAA als Kex1p-Substrat der Nachweis, dass lediglich die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (und in geringerem Maße auch Histidin) in der Lage sind, die Kex1p-Aktivität kompetitiv zu inhibieren (Cooper und Bussey, 1989). In einer  $\Delta kex1$ -Deletionsmutante zeigten alle  $\alpha$ -Derivate mit positiv geladenem Aminosäurerest am C-Terminus (SS-pro- $\alpha^{R/K/H}$ ) und pI-Werten von etwa 4,837, eine stark verminderte Toxizität. Nach Abspaltung des  $\alpha$ -C-terminalen Restes durch Kex1p liegt der pI-Wert bei 4,666 und entspricht somit dem pI der toxischen Variante SS-pro- $\alpha^L$ . Demnach scheint die positive Ladung die Aktivität von K28 $\alpha$  zu

beeinträchtigen und muss daher vermutlich durch die Kex1p-Prozessierung entfernt werden, um die  $\alpha$ -Untereinheit in ihre cytotoxisch aktive Konformation zu überführen.

## **Retrotranslokation: alternative Wege ins Cytosol?**

### **Beteiligung des ERAD-Weges**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass K28 $\alpha$  nach dem posttranslationalen ER-Import innerhalb des Sekretionsweges bis in ein spätes *trans*-Golgi-Kompartiment gelangt. Da jedoch mittels Western Blot keine Sekretion von K28 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte und stattdessen ein Selbstkillerphänotyp zu beobachten war, ist zu erwarten, dass K28 $\alpha$  einen Weg zurück ins Cytosol findet, um von hier aus in den Zellkern zu diffundieren und die produzierende Zelle durch Zellzyklusarrest und Apoptose abzutöten. Da die Degradation löslicher ERAD-Substrate den Transport zwischen ER und Golgi erfordert (Caldwell *et al.*, 2001; Vashist *et al.*, 2001) und zudem bekannt ist, dass sich einige A/B-Toxine als fehlgefaltet maskieren, um als ERAD-Substrat erkannt und auf diesem Weg in das Cytosol transportiert zu werden (Hazes und Read, 1997; Lord, 1996; Simpson *et al.*, 1999), sollte untersucht werden, ob K28 $\alpha$  zurück ins ER transportiert wird und von dort mit Hilfe klassischer ERAD-Komponenten in das Cytosol retrotransloziert. Anhand des Cholera Toxins, einem A(B)<sub>5</sub>-Toxin mit KDEL-Motiv innerhalb der A-Kette, das retrograd über Golgi und ER ins Cytosol gelangt (Lencer *et al.*, 1995), wurde gezeigt, dass der KDEL-Rezeptor (Erd2p)-vermittelte retrograde Transport der A-Untereinheit aus dem Golgi über COPI-Vesikel erfolgt (Majoul *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde der toxische Effekt von SS-pro- $\alpha^R$  auf Mutanten mit Defekt in COPI-Vesikelbildung untersucht. Allerdings zeigte keine der getesteten Deletionsmutanten ( $\Delta sec28$ ,  $\Delta rer1$ ,  $\Delta ret2$ ,  $\Delta ds1$ ) eine Sensitivitätsminderung, so dass eine Beteiligung dieses Komplexes

nicht nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass lediglich nicht-essenzielle Komponenten getestet werden konnten, kann ein Rücktransport zum ER über COPI-Vesikel nicht vollständig ausgeschlossen werden. Darüber hinaus muss der retrograde Transport zum ER nicht zwangsläufig über COPI-Vesikel erfolgen. Einige A/B-Toxine nutzen den Rab6-abhängigen Transport vom Golgi zum ER. Dieser Weg scheint allerdings eher unwahrscheinlich, da er bislang nur für Toxine beschrieben wurde, die kein H/KDEL-Motiv besitzen, beispielweise Shiga Toxin oder Ricin (Sandvig *et al.*, 1992; White *et al.*, 1999; Girod *et al.*, 1999). Um diesen Weg auszuschließen müsste eine entsprechende Deletionsmutante getestet werden. Auf der anderen Seite vermuteten Lencer *et al.* (1995), dass ein COPI-vermittelter retrograder Transport für das Cholera Toxin nicht notwendig ist, da dessen KDEL-Motiv für die Toxizität nicht essenziell ist. Weiterführende Experimente an Cholera Toxin zeigten, dass weder eine Mutation noch das vollständige Entfernen des ER-Retentionssignals KDEL den Zutritt des Toxins zum ER verhindern (Fujinaga *et al.*, 2003). Unter der Annahme, dass K28 auf seiner natürlichen Route erst zurück zum ER gelangt, bevor der Eintritt in das Cytosol erfolgt, sollte die ER-Cytosol-Dislokation und folglich die Toxizität des Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  erhöht werden, wenn die Transportrate zum ER gesteigert wird. So konnte die Toxizität von K28 durch Überexpression des HDEL-Rezeptors Erd2p um den Faktor zwei bis drei gesteigert werden (Eisfeld *et al.*, 2000; Riffer *et al.*, 2002). Für diesen Nachweis wurde ein Derivat eingesetzt, das am  $\alpha$ -C-Terminus das ER-Retentionssignal HDEL trägt. Im reifen heterodimeren K28-Toxin bindet dieses HDEL-Motiv am C-Terminus der K28 $\beta$ -Untereinheit den HDEL-Rezeptor Erd2p bereits auf Ebene der Plasmamembran und vermittelt auf diese Weise die Internalisierung und den retrograden Transport des Toxins über den Golgi-Apparat zum ER (Heiligenstein, 2008; Eisfeld *et al.*, 2000). Durch Anfügen eines solchen Retentionssignales an den C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit wird die Bindung von SS-pro- $\alpha^{HDEL}$  an den HDEL-Rezeptor Erd2p im Golgi-Apparat ermöglicht. Als Folge kommt es zu einem effektiveren

Rücktransport zum ER, wo das Toxin aufgrund des neutralen pH-Wertes vom Erd2p-Rezeptor dissoziiert (Wilson *et al.*, 1993) und nun in das Cytosol gelangen kann. Überraschenderweise wurde jedoch die Toxizität von K28 $\alpha$  durch Überexpression von Erd2p nicht gesteigert. Vielmehr kam es zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Die Toxizität konnte allerdings durch Maskierung des HDEL-Motives durch einen C-terminalen Argininrest wiederhergestellt werden. Diese Maskierung verhindert bei der Reifung des K28ppto $\alpha$ , dass der Toxinvorläufer im Sekretionsweg der produzierenden Zelle durch den HDEL-Rezeptor Erd2p gebunden und zurück ins ER transportiert wird. Dadurch wird gewährleistet, dass K28 vollständig reifen kann und als  $\alpha/\beta$ -Heterodimer sekretiert wird. Die Demaskierung dieses Arginin-Restes erfolgt erst in einem späten Golgi-Kompartiment durch die Wirkung der Carboxypeptidase Kex1p, die das HDEL-Motiv freisetzt (Riffer *et al.*, 2002) und somit die spätere Toxinbindung an die Zielzelle ermöglicht. Da in einem späten Golgi-Kompartiment vermutlich weniger Moleküle des Erd2p-Rezeptors lokalisiert sind, wird nur ein geringer Teil des reifen K28-Toxins im Sekretionsweg zurückgehalten, während die meisten Toxinmoleküle sezerniert werden können. Um auszuschließen, dass eine solche Kex1p-Prozessierung eine Konformationsänderung von SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL R}}$  bewirkt, die für dessen Toxizität nötig ist, wurde das Konstrukt in einer  $\Delta kex1$ -Deletionsmutante exprimiert. Da sich kein veränderter Phänotyp zeigte, scheint entweder keine Prozessierung stattzufinden oder das Entfernen des Argininrestes am C-Terminus des Tetrapeptids HDEL führt nicht zu einer erhöhten Toxizität von K28 $\alpha$ . Umgekehrt induzierte die gleichzeitige Überexpression des HDEL-Rezeptors Erd2p erneut einen Toxizitätsverlust von SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL R}}$ . Es ist zu erwarten, dass ein Überangebot von Erd2p die Effizienz des retrograden Transportes der wenigen K28 $\alpha$ -Moleküle, deren HDEL-Motiv durch Kex1p-Prozessierung demaskiert wurde, steigert. Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass ein schneller effektiver Rücktransport der K28 $\alpha$ -Untereinheit zum ER deren Eintritt ins Cytosol und folglich die Toxizität unterbindet. Werden allerdings nur wenige K28 $\alpha$ -Moleküle zurück zum ER transportiert, wie es nach

Anhängen des C-terminalen Argininrestes an HDEL der Fall ist, bildet sich ein Selbstkillerphänotyp aus. Daraus könnte geschlossen werden, dass K28 $\alpha$  nicht aus dem ER ins Cytosol gelangt, sondern das Cytosol entweder direkt vom Golgi betritt oder dem Sekretionsweg weiter folgt und aus einem endosomalen Kompartiment freigesetzt wird. Während ein direkter Weg aus dem Golgi ins ER bislang nicht beschrieben ist, gelangen einige bakterielle A/B-Toxine mit Hilfe des niedrigen pH-Wertes aus sauren Endosomen in das Cytosol (Sandvig und Olsnes, 1980; Draper und Simon, 1980). Andererseits könnte diese Beobachtung darauf zurückzuführen sein, dass die Bindung an den HDEL-Rezeptor sehr schnell und bereits in einem frühen Golgi-Kompartiment stattfindet. Infolgedessen erreicht SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL}}$  vermutlich kein spätes Golgi-Kompartiment und besitzt im Vergleich zu einer Variante mit maskiertem Retentionssignal eine kürzere Verweildauer im Golgi-Apparat. Dadurch würde eine Kex1/2p-Prozessierung verhindert werden und K28 $\alpha$  in einer nicht-toxischen Konformation zurück in das ER gelangen. Stimmt diese Theorie, sollte der Selbstkillerphänotyp wiederhergestellt werden, wenn SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL}}$  in einer Mutante mit Defekt im retrograden Transport exprimiert wird, so dass K28 $\alpha$  länger im Golgi-Apparat zurückgehalten wird und eine Kex2p-Prozessierung erfolgen kann. Da bisher jedoch keine Komponenten identifiziert werden konnten, die am Rücktransport von K28 $\alpha$  zum ER beteiligt sind, konnte dieses Experiment nicht durchgeführt werden. Parallel könnte ein „Pulse-Labeling“ dieser Toxinvariante und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE Aufschluss darüber geben, ob eine Prozessierung durch Kex2p erfolgt oder nicht. Ein entsprechender Nachweis konnte bislang jedoch noch nicht erbracht werden, da bereits die Signalstärke beider unprozessierten Toxinvarianten (SS-pro- $\alpha^{\text{HDEL(R)}}$ ) zu schwach war, so dass keine kleineren Banden detektierbar waren. Möglicherweise könnte das Entfernen der pro-Region anhand entsprechender V5-getaggtter Varianten nachgewiesen werden. Falls sich bestätigen sollte, dass eine Kex2p-Prozessierung nur bei der Variante mit maskiertem

HDEL-Motiv stattfindet, würde dies gleichzeitig bedeuten, dass die Carboxypeptidase Kex1p entgegen bisheriger Annahmen in einem früheren Golgi-Kompartiment lokalisiert ist als Kex2p, da bei Überexpression von Erd2p die Toxizität von SS-pro- $\alpha^{\text{HDELR}}$  verloren geht und dieser Aktivitätsverlust auf fehlende Kex2p-Prozessierung zurückzuführen ist.

Obwohl frühere Untersuchungen zeigten, dass das exogen applizierte heterodimere K28-Toxin unabhängig von klassischen ERAD-Komponenten und des Ubiquitin-Proteasom-Systems in das Cytosol gelangt, sollte diese Möglichkeit im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Die intrazelluläre Expression des K28-Letalkonstruktes eignete sich hervorragend, um gezielt nach Mutanten mit Defekt in klassischen ERAD-Komponenten zu suchen, die sich resistent gegen K28 $\alpha$  verhalten. Am ER-Export fehlgefalteter Proteine sind verschiedene Proteinkomplexe beteiligt. Je nach Lokalisierung der fehlgefalteten Domänen unterliegen die ERAD-Substrate einem der folgenden Abbauewege: ERAD-L (fehlgefaltete luminaire Proteine), ERAD-M (fehlgefaltete Membrandomäne) oder ERAD-C (fehlgefaltete cytosolische Domäne) (Carvalho *et al.*, 2006, Kostova *et al.* 2007; Denic *et al.*, 2006). Fehlgefaltete ER-luminale Proteine nutzen den ERAD-L-Weg, der über den HRD1-Komplex vermittelt wird (Vashist und Ng, 2004). Sollte sich K28 $\alpha$  als ERAD-Substrat tarnen, ist anzunehmen, dass dieser Komplex involviert ist, da K28 $\alpha$  löslich im ER-Lumen vorliegt. Tatsächlich konnten einige Komponenten des HRD1-Komplexes identifiziert werden, die eine verminderte Sensitivität gegen die intrazellulär exprimierte K28 $\alpha$ -Untereinheit zeigten und demnach an deren Retrotranslokation beteiligt sind. Neben der Hauptkomponente des HRD1-Komplexes, der Hrd1p-Ubiquitin-Ligase, die möglicherweise als Exportkanal fungiert (Gauss *et al.*, 2006), sind Cue1p, Der1p und Yos9p für die Toxizität von K28 $\alpha$  von Bedeutung. Cue1p verankert das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7p an der ER-Membran (Biederer *et al.*, 1997). Für Letzteres konnte keine direkte Beteiligung nachgewiesen werden. Lediglich  $\Delta ubc7\Delta hrd1$  und  $\Delta ubc7\Delta ubc1$ -Doppelmutanten

zeigten einen Phänotyp. Gauss und Mitarbeiter wiesen eine Assoziation zwischen Der1p und Hrd1p bzw. Hrd3p nach. Der1p ist an der Erkennung und Rekrutierung von löslichen ERAD-Substraten beteiligt (Knop *et al.*, 1996; Gauss *et al.*, 2006; Taxis *et al.*, 2003). Aufgrund seines Aufbaus aus vier Transmembransegmenten wurde auch über eine Rolle von Der1p als möglicher Protein-führender Kanal spekuliert (Lilley und Ploegh, 2004). Die Beteiligung von Yos9p wurde nicht erwartet, da dieses Lectin-ähnliche Protein hauptsächlich für die Erkennung N-glykosylierter Substrate beschrieben ist (Denic *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Buschhorn *et al.*, 2004). Allerdings wechselwirkt Yos9p mit CPY\* selbst dann noch, wenn dessen Glykosylierungsstelle modifiziert ist (Bhamidipati *et al.*, 2005). Zusätzlich gelang Nico Schäuble im Rahmen seiner Diplomarbeit der Nachweis einer direkten *in vivo*-Interaktion zwischen Yos9p- und K28 $\alpha$ -mCherry-Fusionen (Schäuble, 2008). Auch die Wechselwirkung mit Der1p konnte auf diese Weise bestätigt werden. Folglich scheint der HRD1-Komplex oder zumindest einige seiner Komponenten am ER-Export von K28 $\alpha$  beteiligt zu sein. Aufgrund der Beobachtung, dass es in keiner Mutante zur Ausbildung einer vollständigen Resistenz kam, kann spekuliert werden, dass das K28-Toxin alternative Strategien verfolgt, um seinen Zielort zu erreichen. Der DOA10-Komplex vermittelt die ER-assoziierte Degradation von Membranproteinen mit fehlgefalteter cytosolischer Domäne (Ravid *et al.*, 2006; Huyer *et al.*, 2004) und sollte folglich nicht am ER-Export von K28 $\alpha$  beteiligt sein. Dieser Komplex unterscheidet sich vom HRD1-Komplex durch die Abwesenheit der ER-luminalen Komponenten Hrd3p, Kar2p, Yos9p sowie der Membranuntereinheiten Der1p und Usa1p. Spezifisch für diesen Komplex ist die Ubiquitin-Ligase Doa10p als funktioneller Kern sowie das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc6p (Kostova *et al.*, 2007). Während die Deletion von *DOA10* keinen Sensitivitätsverlust hervorrief, war eine Mutante in Abwesenheit von Ubc6p in der Lage, die *in vivo* Expression des K28-Letalkonstruktes zu überleben. Denkbar wäre, dass dieses Enzym entgegen bisheriger Annahmen zusammen mit der Ubiquitin-Ligase Hrd1p ERAD-Substrate

polyubiquitinieren kann. Aktuelle Ergebnisse von Metzger *et al.* (2008) belegen, dass der DOA10-Komplex auch fehlgefaltete cytosolische Substrate erkennt und der proteasomalen Degradation zuführt. Da K28 $\alpha$  posttranslational in das ER importiert wird, wäre auch denkbar, dass ein Teil der Letalkonstrukte direkt nach der Synthese an freien Ribosomen im Cytosol als fehlgefaltet erkannt und degradiert wird. Wie ERAD-Substrate als solche erkannt werden, ist noch nicht vollständig verstanden. Molekulare Chaperone scheinen an diesem Selektionsprozess beteiligt zu sein, da sie die Proteinfaltung unterstützen. Es wird vermutet, dass beispielsweise Kar2p luminalen Substrate in einer löslichen, translokationskompetenten Form hält und so deren Abbau über ERAD erleichtert (Kabani *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte eine verlängerte Assoziation zwischen ER-luminalen und cytosolischen Chaperonen mit verschiedenen ERAD-Substraten beobachtet werden (Schmitz *et al.*, 1995, de Virgilio *et al.*, 1999). Während bestimmte N-Glykanstrukturen fehlgefalteter Glykoproteine durch Lectine und Lectin-ähnliche Proteine wie Calnexin (Cne1p), Yos9p und Htm1p erkannt werden (Nishikawa *et al.*, 2005; Nakatsukasa *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2001; Buschhorn, *et al.*, 2004; Denic *et al.*, 2006; Clerc *et al.*, 2009), wird vermutet, dass molekulare Chaperone der Hsp70-Familie (z.B. Kar2p) kurze hydrophobe Polypeptid-Motive binden, die auf der Oberfläche fehlgefalteter Proteine exponiert vorliegen (Helenius und Aebi, 2004). Co-Chaperone der Hsp40-Familie regulieren diese ATP-abhängige Protein-Bindung ebenso wie die spätere Freisetzung. Es wurde bereits gezeigt, dass Kar2p in der ER-assoziierten Degradation vieler Substrate involviert ist (Plemper *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999). Eisfeld *et al.* (2000) konnten bereits nachweisen, dass Kar2p und Cne1p für die Zielsteuerung von exogen appliziertem K28 Toxin in das Cytosol der Zielzelle benötigt werden. Entsprechende Mutanten zeigten sich im Agardiffusionstest entweder vollständig resistent (*kar2-203*, *kar2-191*,  $\Delta$ *cne1*) oder deutlich vermindert sensitiv (*kar2-165*) und akkumulierten das internalisierte Toxin in der intrazellulären

Membranfraktion (Eisfeld *et al.*, 2000; Eisfeld, 2001). Da die temperatursensitiven *kar2*-Mutanten im Wachstumstest keinen eindeutigen Phänotyp zeigten, diente Kar2p als Testprotein für den bimolekularen Fluoreszenzkomplementations-Assay. Auf diese Weise gelang der Nachweis einer *in vivo*-Interaktion mit dem Letalkonstrukt SS-pro- $\alpha^R$  (Schäuble, 2008). Da Kar2p vielfältige Funktionen übernimmt und neben dem ER-Export auch für den posttranslationalen ER-Import und die Faltung neusynthetisierter Proteine wichtig ist (Matlack *et al.*, 1999; Simons *et al.*, 1995), ist unklar, ob diesem Chaperon tatsächlich eine Rolle bei der Retrotranslokation von K28 $\alpha$  zukommt. Bei Calnexin handelt es sich um ein Lectin, das fehlgefaltete Glykoproteine im ER zurückhält und zusammen mit Kar2p die korrekte Faltung kontrolliert. Dieses Lectin ist nicht nur am retrograden Transport fehlgefalteter Proteine beteiligt (McCracken und Brodsky, 1996), sondern wird zudem für den ER-Export des Cholera Toxins benötigt (Brodsky *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000). Nach intrazellulärer Expression des K28-Letalkonstruktes bildete eine Mutante in Abwesenheit von Cne1p eine fast vollständige Resistenz aus. Es ist jedoch völlig unklar, welche Rolle Calnexin bei der Retrotranslokation von K28 $\alpha$  spielt, da die  $\alpha$ -Untereinheit keine N-Glykosylierungsstellen besitzt. Für alle weiteren in dieser Arbeit getesteten ER-luminalen Chaperone (Scj1p, Jem1p, Lhs1p, Htm1p) konnte keine Beteiligung an der Cytosol-Dislokation von K28 $\alpha$  nachgewiesen werden. Entsprechende Mutanten zeigten einen Selbstkillerphänotyp. Selbst eine  $\Delta scj1\Delta jem1$ -Doppelmutante zeigte eine deutliche Toxinsensitivität, obwohl sie sich in Abwesenheit dieser beiden Hsp40-Co-Chaperone resistent gegen exogen appliziertes Toxin verhielt und das internalisierte Toxin in intrazellulären Membranen (vermutlich im ER) akkumulierte (Heiligenstein *et al.*, 2006). Von den getesteten cytosolischen Chaperonen schienen Ssb1p und insbesondere Ydj1p die Aktivität von K28 $\alpha$  zu beeinflussen. Da Ssb1p eher am posttranslationalen ER-Import beteiligt ist (Pfund *et al.*, 1998), erscheint eine Beteiligung am Retrotranslokationsmechanismus unwahrscheinlich. In Untersuchungen von Zhang *et al.* (2001) wurde

der CFT-Rezeptor in *ssa*-Mutanten stabilisiert. Generell ist eine Beteiligung cytosolischer Chaperone für die ER-assoziierte Degradation fehlgefalteter Membranproteine mit cytosolischer Domäne zu erwarten (Huyer *et al.*, 2004). Daher spielen die beteiligten cytosolischen Chaperone wahrscheinlich eher eine Rolle beim ER-Import von K28 $\alpha$ . Ein Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte es daher sein, die Beteiligung des HRD1-Komplexes und verschiedener Chaperone an der K28 $\alpha$ -Retrotranslokation biochemisch zu bestätigen. Nach „Pulse-Labeling“ wäre abhängig von der Mutation eine Stabilisierung von K28 $\alpha$  im ER oder Cytosol der entsprechenden ERAD-Mutanten zu erwarten. Auch eine Beteiligung des Sec61-Translokons am ER-Export könnte auf diese Weise nachgewiesen werden.

### **Hinweise auf Ubiquitinierung der $\alpha$ -Untereinheit**

Im Zuge der ER-Qualitätskontrolle werden fehlgefaltete ERAD-Substrate polyubiquitiniert und so für den schnellen proteasomalen Abbau markiert. An der Anheftung von Ubiquitin an Zielproteine sind drei Arten von Enzymen beteiligt. Zunächst stellt ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) eine Thioesterbindung zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und einem internen Cysteinrest her. Nach dieser Aktivierung überträgt das E1-Protein das Ubiquitinmolekül auf einen Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2). Mit Hilfe eines dritten Enzyms, der E3 Ubiquitin-Ligase, wird das aktivierte Ubiquitin von dem E2-Protein auf einen Lysinrest des Substrates übertragen (Haas *et al.*, 1982; Passmore und Barford, 2004). Seltener kann Ubiquitinierung auch am N-Terminus des Zielproteines erfolgen (Breitschopf *et al.*, 1998). Breinig *et al.* (2006) zeigten, dass Ubiquitinierung und proteasomale Degradation zwar bei der Ausbildung der Toxin-Immunität eine Rolle spielen, nicht aber für die K28-Retrotranslokation von internalisiertem Toxin. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass nach Internalisierung des reifen, heterodimeren K28-Toxins lediglich die  $\beta$ -, nicht aber die  $\alpha$ -Untereinheit

einer Ubiquitinierung im Cytosol unterliegt (Eisfeld, 2001). Folglich scheint das Ubiquitin-Proteasom-System nicht an der ER-Cytosol-Dislokation von K28 beteiligt zu sein. Dennoch deutete die Beobachtung, dass die Ubiquitinligase Hrd1p und die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p die Toxizität von K28 $\alpha$  beeinflussten, indirekt auf eine Ubiquitinierung von K28 $\alpha$  hin und lieferte Anlass für weitere Untersuchungen.

Der CDC48-Komplex ist an der Erkennung und Proteasom-Präsentation polyubiquitinerter ERAD-Substrate beteiligt (Bays und Hampton, 2002). Die homohexamere AAA ATPase VCP, das Säugerhomolog zu Cdc48p, erkennt *in vitro* spezifisch polyubiquitinierte Proteine (Dai und Li, 2001). In Abwesenheit von Cdc48p oder einer seiner Cofaktoren Ufd1p oder Npl4p ist die proteasomale Degradation von HMG-CoA Reduktase, Ste6p und CFTR (Bays *et al.*, 2001; Rabinovich *et al.*, 2002; Huyer *et al.*, 2004; Gnann *et al.*, 2004) sowie löslicher ERAD-Substrate wie CPY\* (Jarosch *et al.*, 2002), Spt23 oder Mga2 (Hitchcock *et al.*, 2001; Rape *et al.*, 2001) blockiert und die Proteine akkumulieren in ihrer polyubiquitinierten Form in der ER-Membran. Es wird vermutet, dass der CDC48-Komplex die treibende Kraft bereitstellt, um die Freisetzung der polyubiquitinierten Substrate von der ER-Membran zu vermitteln. Ob der Komplex für die Degradation jedes (ubiquitinierten) ERAD-Substrates benötigt wird, ist bislang noch nicht geklärt (Vembar und Brodsky, 2008). Wie bereits frühere Untersuchungen belegten, hängt die Retrotranslokation von internalisiertem K28-Toxin weder vom CDC48-Komplex, noch von den „Zulieferproteinen“ Dsk2p und Rad23p ab. Entsprechende Mutanten *cdc48-3/cdc48-1*, *npl4-1*, *npl4-4* und *ufd1-1* sowie  $\Delta$ *dsk2* und  $\Delta$ *rad23* zeigten Wildtypsensitivität gegen exogen appliziertes K28-Toxin (Heiligenstein *et al.*, 2006). Auch in dieser Arbeit konnte eine Beteiligung des Komplexes an der Retrotranslokation der intrazellulär exprimierten  $\alpha$ -Untereinheit nicht nachgewiesen werden, da eine  $\Delta$ *npl4*-Deletionsmutante nach *in vivo*-Expression eines K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes einen Suizid-Phänotyp ausbildete. Selbst mit Hilfe des BiFC-Assays

gelang kein Interaktionsnachweis zwischen SS-pro- $\alpha^R$  und Cdc48p oder Ufd1p (Schäuble, 2008; Schorr, persönliche Mitteilung). Nach der Freisetzung der ERAD-Substrate von der ER-Membran binden die cytosolischen Proteine Dsk2p und Rad23p polyubiquitinierte ERAD-Substrate über ihre C-terminale Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA). Darüber hinaus besitzen sie eine N-terminale „Ubiquitin-like“ (UBL) Domäne, die die Bindung an eine spezifische Stelle der 19S-Kappe des 26S Proteasoms erlaubt. Diese beiden Bindestellen erlauben den Zulieferproteinen Dsk2p und Rad23p den Transfer ubiquitinerter Proteine von der ER-Membran zum Proteasom (Chen und Madura, 2002; Fukunoshi *et al.*, 2002; Medicherla *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen an internalisiertem Toxin (Heiligenstein *et al.*, 2006), führte die Deletion von *RAD23* zu einer verminderten Sensitivität gegen das intrazellulär exprimierte K28 $\alpha$ -Letalkonstrukt, wohingegen sich in Abwesenheit von Dsk2p ein Selbstkillerphänotyp zeigte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Rad23p an der Toxizität von K28 $\alpha$  beteiligt ist und möglicherweise polyubiquitinierte Toxinmoleküle zum Proteasom überführt. Andererseits schien Ufd2p nicht an einer möglichen Polyubiquitinierung von K28 $\alpha$  beteiligt zu sein. Ufd2p ist das erste identifizierte E4 Enzym, das Mono-/Di-Ubiquitinreste zu einer Polyubiquitinkette verlängert (Koegl *et al.*, 1999). Ufd2p bindet Cdc48p, sofern Letzteres im Komplex mit seinen Adaptoren Ufd1p/Npl4p vorliegt. Richly *et al.* (2005) konnten anhand eines *in vitro* Assays nachweisen, dass Cdc48p im Komplex mit Ufd2p die Länge der gebildeten Ubiquitinkette von ERAD-Substraten auf kleinere Strukturen aus vier bis sechs Ubiquitinresten begrenzt. Ausgehend von dieser Beobachtung und der Tatsache, dass die Proteasomen-Untereinheit Rpn10p bevorzugt Polyubiquitinketten bindet, präsentierten die Autoren zwei alternative Modelle. Das erste Modell besagt, dass Ufd2p und Cdc48p ERAD-Substrate mit einer verkürzten Ubiquitinkette versehen. Nach der Erkennung dieser Modifikation durch Rad23p und Dsk2p werden die Substrate mit Hilfe der beiden Eskortproteine zum Proteasom dirigiert. Eine direkte Wechselwirkung zwischen Ufd2p und

Rad23p konnte bereits nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2004). In einem zweiten Modell werden fehlgefaltete, polyubiquitinierte Proteine an der ER-Membran direkt von Rpn10p erkannt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier Rad23p oder Dsk2p beteiligt sind. Da in der vorliegenden Arbeit weder eine Beteiligung des CDC48-Komplexes, noch von Ufd2p am ER-Export von K28 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte, wohl aber der Zubringer Rad23p involviert zu sein scheint, könnte die K28 $\alpha$ -Retrotranslokation durch Rpn10p-Erkennung ablaufen – eine Theorie, die noch geprüft werden müsste. Darüber hinaus wird neben Cdc48p eine ATPase des 19 S regulatorischen Partikels des Proteasoms als alternativer Kandidat für die Bereitstellung der Energie zur Retrotranslokation von ERAD-Substraten diskutiert (Carlson *et al.*, 2006; Lipson *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004). Mit Hilfe eines *in vitro* Assays konnte bereits gezeigt werden, dass die 19 S Untereinheit des Proteasoms ausreicht, um die ATP-getriebene ER-Cytosol-Dislokation des proalpha-Faktors zu vermitteln (Lee *et al.*, 2004). Beruhend auf dieser Idee untersuchten Lipson *et al.* (2008) den Einfluss der ATPase-Aktivität aller sechs AAA ATPasen (Rpt1-6) des 19 S regulatorischen Partikels auf die Retrotranslokation von ERAD-Substraten. In einer entsprechenden Rpt4-Mutante mit einer Substitution im Walker A ATP-Bindemotiv (Rubin *et al.*, 1998) akkumulierte CPY\* im Lumen von Mikrosomen, während CPY\* in einer zweiten Mutante mit ERAD-Defekt, rpt2RF, im Cytosol stabilisiert wurde (Lipson *et al.*, 2008). Ausgehend von diesen Ergebnissen entstanden zwei Modellvorschläge. Das erste Modell schlägt vor, dass beide AAA ATPasen parallel Substrate aus dem ER ziehen. In einem zweiten Modell zieht Cdc48p ERAD-Substrate aus dem ER, die anschließend mit Hilfe von Rpt4p zum 26 S Proteasom überführt und mit Hilfe von Rpt2p im 20 S Kernpartikel degradiert werden. Es wäre also durchaus möglich, dass K28 $\alpha$  vollkommen oder zumindest teilweise unabhängig von der ATPase-Aktivität von Cdc48p in das Cytosol disloziert. Die Analyse der rpt4R-Mutation auf die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$  wäre sinnvoll, um einen tieferen Einblick in den genauen Retrotranslokationsmechanismus der  $\alpha$ -Untereinheit zu erhalten.

Die in dieser Arbeit getesteten Proteasommutanten mit Defekt in der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität *pre1-1* und *pre2-2* (Heinemeyer *et al.*, 1993) konnten aufgrund ihrer Temperatursensitivität nur im Agardiffusionstest gegen exogen appliziertes K28-Dimer eingesetzt werden. Beide Mutanten wiesen Wildtypsensitivität auf.

Da die Anheftung von Polyubiquitinketten aus mindestens vier Ubiquitin-Molekülen als Erkennungsmotiv für das 26S Proteasom dient und die Substrate zum Abbau markiert, haben invasive A/B-Toxine, die mit Hilfe von ERAD-Komponenten in das Cytosol transportiert werden, eine Strategie entwickelt, sich dem Abbau weitgehend zu entziehen. Durch eine deutlich verminderte Anzahl interner Lysinreste gelingt es ihnen, das Maß der Polyubiquitinierung so gering zu halten, dass zumindest einige Toxinmoleküle der proteasomalen Degradation entkommen (Hazes und Read, 1997; London und Luongo, 1989). So konnte unter anderem für die A-Ketten der Toxine Ricin und Abrin gezeigt werden, dass das Einfügen von vier zusätzlichen Lysinresten die Toxizität erheblich vermindert, während dieser Effekt durch den Einsatz von Proteasominhibitoren aufgehoben werden konnte (Deeks *et al.*, 2002). Wie Ricin A und Abrin A, die natürlicherweise lediglich zwei bzw. drei Lysinreste enthalten (Deeks *et al.*, 2002), besitzt auch die cytotoxische  $\alpha$ -Untereinheit von K28 mit drei Lysinresten einen geringen Lysinanteil. Diese Tatsache weist erneut daraufhin, dass K28 $\alpha$  einem ähnlichen Weg folgen könnte wie oben genannte A/B-Toxine, da die A-Kette anderer Toxine dieser Familie, die direkt über saure Endosomen ins Cytosol gelangen, „normale“ Lysingehalte aufweisen. Beispielsweise besitzt Diphterie Toxin A 16 Lysine (London und Luongo, 1989; Deeks *et al.*, 2002). Um einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Ubiquitinmodifikation von K28 $\alpha$  und deren Bedeutung für die Retrotranslokation zu erhalten, wurde daher der Einfluss von Lysinresten auf die *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$  analysiert. Zu diesem Zweck kam eine Lysin-freie Variante des K28-Letalkonstruktes zum Einsatz, die im Rahmen der Dissertation von Sendzig entstand. In diesem Derivat wurden alle drei Lysine der  $\alpha$ -Untereinheit durch Arginin

ersetzt (Sendzig, 2006). Wie erwartet, zeichnete sich diese Variante SS-pro- $\alpha^R$ K-0 im Wachstumstest durch einen erheblichen Toxizitätsverlust aus, was indirekt auf eine Ubiquitinierung und deren Bedeutung für den ER-Export von K28 $\alpha$  schließen lässt. In früheren Untersuchungen zeigten auch die Lysin-freien Derivate  $\alpha/\beta\Delta$ Lys und ppto $\Delta$ Lys im Agardiffusionstest leicht verringerte Aktivität (Sendzig, 2006). Nichtsdestotrotz war die Lysin-freie Variante  $\alpha/\beta\Delta$ Lys noch in der Lage, das ER zu verlassen und konnte mittels subzellulärer Fraktionierung in der cytosolischen Fraktion detektiert werden (Heiligenstein *et al.*, 2006). Ubiquitin besitzt sieben interne Lysinreste, von denen mindestens fünf als Anheftungsstellen für Polyubiquitin dienen können (Arnason und Ellison, 1994). Interessant sind vor allem Lys<sup>48</sup>-verknüpfte Polyubiquitinketten, da diese bevorzugt vom 26 S Proteasom erkannt werden (Chau *et al.*, 1989; Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). Auch Lys<sup>11</sup>- und Lys<sup>29</sup>-verknüpfte Ketten könnten Proteine zum Proteasom steuern (Johnson *et al.*, 1995; Baboshina und Haas, 1996), während die Polyubiquitinierung über Lys<sup>63</sup> eher eine Rolle bei Stressantwort, Endozytose und Signaltransduktion spielt. Finley und Mitarbeiter (1994) zeigten, dass die Überexpression einer mutierten Ubiquitinvariante (UbK48R), deren interner Lys<sup>48</sup>-Rest durch Arginin ersetzt wurde, das „Proteinturnover“ der Zelle teilweise behindert, da eine Störung der Polyubiquitinierung induziert wird. Der Einsatz dieser Ubiquitin-Mutante bewirkte beispielsweise eine Stabilisierung von Sec61p und Sss1p im ER (Biederer *et al.*; 1996). Die Überexpression einer Ubiquitinvariante, in der beide Lysinreste an den Positionen 48 und 63 durch Arginin ausgetauscht wurden (UbRR<sup>48/63</sup>), verhindert durch ihren Einbau das Anheften weiterer Ubiquitinmoleküle. Dadurch ist die Bildung funktionaler Polyubiquitinketten gestört (Arnason und Ellison, 1994) und es kommt zur Akkumulation fehlgefalteter, nicht-ubiquitinerter Substrate im ER. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Koexpression von SS-pro- $\alpha^R$  und UbRR<sup>48/63</sup> nachgewiesen werden, dass bei fehlender Polyubiquitinierung die Toxinaktivität von K28 $\alpha$

vollständig verloren geht. Diese Beobachtung stützt wiederum die These, dass der ER-Export von K28 $\alpha$  dessen Ubiquitinierung erfordert.

Der intrazelluläre Pool an freiem Ubiquitin wird durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) aufrechterhalten, die die Disassemblierung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten katalysieren (Chung und Baek, 1999). Doa4p gehört zu einem der wichtigsten Proteasom-assoziierten DUBs, deren Funktion unentbehrlich für die Degradation ubiquitiniertes Proteine am 26 S Proteasom ist (Guterman und Glickman, 2004; Papa und Hochstrasser, 1993). Der proteolytische Abbau Ubiquitin-abhängiger Substrate ist in  $\Delta$ doa4-Mutanten stark beeinträchtigt. Infolgedessen kommt es zu einer Stabilisierung zweier artifizieller Substrate Leu- $\beta$ gal und Ub-pro- $\beta$ gal um das Zehn- bzw. Zwanzigfache. Da beide Substrate multiubiquitiniert vorliegen, und das Maß der Ubiquitinierung im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist, schlagen Papa und Hochstrasser (1993) ein Modell vor, in dem Doa4p die Disassemblierung von Multiubiquitinketten an Proteinen bewerkstelligt, die noch am 26 S Proteasom gebunden sind. In der Tat scheint K28 $\alpha$  in Abwesenheit von Doa4p im Cytosol stabilisiert zu werden, da die toxische  $\alpha$ -Untereinheit im Vergleich zum Wildtyp einen stärkeren Selbstkillerphänotyp verursacht. Während der ER-Export des internalisierten reifen heterodimeren K28-Toxins unabhängig vom Ubiquitin-Proteasom-System stattfindet, scheint die intrazellulär exprimierte  $\alpha$ -Untereinheit einem anderen Weg zu folgen. Zusammengefasst lässt die Mehrheit der Ergebnisse dieser Arbeit auf einen Retrotranslokationsmechanismus schließen, der eine Polyubiquitinierung von K28 $\alpha$  erfordert, wobei der genaue Weg zum Proteasom noch nicht aufgeklärt werden konnte. Trotz der vielen indirekten Hinweise auf eine Polyubiquitinierung der K28 $\alpha$ -Untereinheit konnte ein biochemischer Nachweis einer solchen Modifikation im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Ubiquitinierte Toxinvarianten konnten weder im Western Blot mit monoklonalem Ubiquitin-Antikörper, noch nach „Pulse Labeling“ mit [<sup>35</sup>S]-Methionin detektiert werden. Auch der Versuch, eine *in vivo* Interaktion zwischen

Ubiquitin und SS-pro- $\alpha^R$  mit Hilfe des BiFC-Assays nachzuweisen, missglückte (Schorr, 2009; persönliche Mitteilung). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass hierfür experimentelle Grenzen die Ursache sind. Bisher gelang es nur mittels radioaktiver Markierung (oder Epitop-Tagging), das K28 $\alpha$ -Letalkonstrukt im Zelllysate nachzuweisen, wobei die Signalintensität äußerst schwach war. Da bereits gezeigt wurde, dass in einigen Fällen eine einzige Polyubiquitinkette als Erkennungssignal für das Proteasom und anschließenden Abbau ausreicht (Breitschopf *et al.*, 1998), ist zu erwarten, dass lediglich ein geringer Teil des polyubiquitinierten Toxins seiner Degradation entgehen kann, so dass sich vermutlich nur sehr wenige polyubiquitinierte K28 $\alpha$ -Moleküle im Cytosol befinden. Möglicherweise liegt diese Anzahl unterhalb der Nachweisgrenze eines Western Blots oder der Fluoreszenzdetektion. Ein sinnvoller Versuchsansatz könnte der Nachweis im Zelllysate einer Mutante mit Defekt in der Deubiquitinierung und proteasomalen Degradation sein, in deren Cytosol polyubiquitinierte Toxinmoleküle akkumulieren sollten. Im Gegensatz dazu führte das Einfügen zusätzlicher Lysinreste nur zu einem geringen Anstieg der cytosolischen Degradation des Cholera Toxins (Rodighiero *et al.*, 2002). Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer schnellen Rückfaltung von A/B-Toxinen im Cytosol, da gefaltete Proteine nicht vom Proteasom degradiert werden, selbst dann nicht, wenn sie viele Lysinreste besitzen (Thrower *et al.*, 2000). Ein biochemischer Nachweis der Ubiquitinierung wäre somit wünschenswert, um die letzten Zweifel zu beseitigen.

---

## Vergleich der Retrotranslokation des $\alpha/\beta$ -heterodimeren K28-Toxins und der *in vivo* exprimierten $\alpha$ -Untereinheit: zwei Modellvorschläge

Nach den bisherigen Ergebnissen deutet alles daraufhin, dass das reife heterodimere K28-Toxin ( $\alpha/\beta^{\text{HDEL}}$ ) und die intrazellulär exprimierte  $\alpha$ -Untereinheit unterschiedlichen Wegen folgen, um aus dem ER in das Cytosol zu gelangen. Anhand der Ergebnisse früherer Arbeiten und der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden im Folgenden zwei Modelle vorgestellt, die die Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser beiden Retrotranslokationsmechanismen deutlich machen sollen. Zum besseren Überblick sind zunächst in Tabelle 16 die Ergebnisse aller relevanten Hefemutanten und die Beteiligung der entsprechenden Proteine an der Toxizität von K28 bzw. K28 $\alpha$  zusammengefasst.

### 1) ER-Cytosol-Dislokation des reifen K28-Toxins $\alpha/\beta^{\text{HDEL}}$

Untersuchungen zur ER-Cytosol-Dislokation von internalisiertem K28 wurden hauptsächlich von Katrin Eisfeld (2001) und Susanne Heiligenstein (2008) durchgeführt. Ihre wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 16 (linke Spalte) und in dem hier präsentierten Modell (Abbildung 55A) zusammengefasst. Anhand von Zellfraktionierungsstudien und Sensitivitätstests ausgewählter Hefemutanten konnte gezeigt werden, dass die Dislokation von K28 in das Cytosol auf die Funktionen ER-luminaler Chaperone angewiesen ist. Neben dem Hsp70 Chaperon Kar2p und seinen beiden Cofaktoren Scj1p und Jem1p spielt auch Calnexin eine wichtige Rolle beim ER-Export von K28, obwohl dessen Funktion bisher eigentlich nur für N-glykosylierte Proteine beschrieben war. Die Deletion von Genen der SSA-Familie, die für cytosolische Chaperone kodieren, hatte keinen negativen Einfluss auf die Toxinaktivität.

**Tabelle 16: Vergleich der in dieser Arbeit getesteten relevanten Mutanten und die Beteiligung der entsprechenden Proteine an der ER-Cytosol-Retrotranslokation von K28 $\alpha$  nach *in vivo* Expression des K28-Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  bzw. nach exogener Applikation des reifen, heterodimeren K28-Toxins**

Experimenteller Nachweis mittels Agardiffusionstest, BiFC, Wachstumstest, Zellfraktionierung

	nach exogener Applikation des reifen K28-Toxins	nach intrazellulärer Expression von SS-pro- $\alpha^R$
<b>HRD1-Komplex</b>		
$\Delta hrd1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
$\Delta hrd3$	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>W</sup>
$\Delta cue1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W/B</sup>
$\Delta ubc1\Delta ubc7$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
$\Delta ubc1\Delta hrd1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
$\Delta ubc7\Delta hrd1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
$\Delta ubx2$	?	Nein <sup>W</sup>
$\Delta usa1$	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>W</sup>
$\Delta der1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W/B</sup>
$\Delta yos9$	?	Ja <sup>B</sup>
$\Delta htm1$	Nein <sup>A</sup>	(Ja) <sup>W</sup>
<b>CDC48-Komplex</b>		
<i>cdc48-3</i>	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>B</sup>
<i>ufd1-1</i>	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>B</sup>
$\Delta npl4$	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>W</sup>
<b>Ubiquitin-Proteasom-System</b>		
$\Delta ufd2$	?	Nein <sup>W</sup>
<i>pre1-1, pre2-2</i>	Nein <sup>A</sup>	?
$\Delta dsk2$	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>W</sup>
$\Delta rad23$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
$\Delta$ Lys-Variante	vermindert toxisch <sup>A,Z</sup> gelangt ins Cytosol <sup>Z</sup>	fast vollständiger Aktivitätsverlust <sup>W</sup>
<b>Chaperone</b>		
<i>kar2</i>	Ja <sup>A/Z</sup>	Ja <sup>B</sup>
$\Delta pdi1$	Ja <sup>A,Z/P</sup>	Ja <sup>B</sup>
$\Delta cne1$	Ja <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
$\Delta scj1\Delta jem1$	Ja <sup>A/Z</sup>	Nein <sup>W,B</sup>
$\Delta ssa1$	Nein <sup>A</sup>	Nein <sup>W</sup>
$\Delta ssa3$	Nein <sup>A</sup>	(Ja) <sup>W</sup>
$\Delta ssb1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>
<b>Sonstige Proteine</b>		
<i>sec61</i>	Ja <sup>Z</sup>	Ja <sup>B*</sup> (Import u./od. Export?)
$\Delta pmr1$	Ja <sup>A/Z</sup>	Nein <sup>W</sup>
$\Delta vcx1$	Nein <sup>A</sup>	Ja <sup>W</sup>

Eine zentrale Aufgabe scheint hingegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Sekretionsweg zu besitzen, da die Abwesenheit der im Golgi lokalisierten P-Typ ATPase Pmr1p zur vollständigen Toxinresistenz führte. Wie bereits für andere A/B-Toxine wie Ricin A, Cholera Toxin und Exotoxin A gezeigt werden konnte (Wesche *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000; Koopmann *et al.*, 2000), erreicht K28 das Cytosol über den Translokationskomplex Sec61p, der auch den ER-Import neu synthetisierter Proteine vermittelt (Johnson und van Waes, 1999). Klassische ERAD-Komponenten des HRD1-Komplexes sind für den ER-Export von K28 nicht notwendig, da die Toxinsensitivität von  $\Delta hrd1$ ,  $\Delta ubc1\Delta hrd1$ ,  $\Delta ubc7\Delta hrd1$ ,  $\Delta ubc1\Delta ubc7$ ,  $\Delta cue1$  und  $\Delta der1$ -Mutanten nicht beeinträchtigt war. In dieser Arbeit konnten die früheren Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich zeigten Mutanten mit Deletion von *HRD3*, *USA1* oder *HTM1* im Agardiffusionstest Wildtypsensitivität. Auch eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems konnte nicht nachgewiesen werden. Weder Komponenten des CDC48-Komplexes oder des Proteasoms, noch die Zulieferproteine Dsk2p und Rad23p beeinflussen die Aktivität von K28. Nach Behandlung sensibler Hefen mit Lysin-freien Toxinvarianten konnte K28 im Cytosol detektiert werden, der ER-Export war demnach trotz fehlender Ubiquitinierung nicht beeinträchtigt.

## 2) Retrotranslokation von K28 $\alpha$ nach Expression im ER

Während das heterodimere Toxin das Cytosol unabhängig von ERAD und der Ubiquitinierungsmaschinerie erreicht, nutzt die toxische K28 $\alpha$ -Untereinheit nach intrazellulärer Expression im ER einer sensiblen Hefe einen völlig anderen Weg. In dieser Arbeit wurden durch *in vivo* Expression eines K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes in ausgewählten Deletionsmutanten zelluläre Komponenten identifiziert, die an der Retrotranslokation von K28 $\alpha$  aus dem ER in das Cytosol beteiligt sind. Ausgehend von den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wird ein

Modell vorgeschlagen, das den intrazellulären Transport der K28 $\alpha$ -Untereinheit nach Expression im ER beschreibt (Abbildung 55B). Nach dem Eintritt in das ER und Abspaltung der Signalsequenz wird pro- $\alpha^R$  in COPII-Vesikel verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert. In einem späten Kompartiment erfährt das Toxin hier zwei wichtige Prozessierungen: die Abspaltung der pro-Region durch Kex2p und des  $\alpha$ -C-terminalen Argininrestes durch Kex1p. Erst durch diese Modifikationen erhält die  $\alpha$ -Untereinheit ihre toxische Konformation. Bereits die Beteiligung der beiden Proteine Erv29p und Bst1p, die spezifisch fehlgefaltete Proteine in COPII-Vesikel verpacken (Vashist *et al.*, 2001; Caldwell *et al.*, 2001) und zum Golgi transportieren lieferten einen ersten Hinweis, dass sich K28 $\alpha$  als ERAD-Substrat tarnt, um in das Cytosol zu gelangen. Obwohl ein Rücktransport zum ER (über COPI-Vesikel) nicht direkt nachgewiesen werden konnte, erreicht zumindest ein Teil der K28 $\alpha$ -Moleküle das Cytosol über den in der ER-Membran lokalisierten HRD1-Komplex. Im Gegensatz zum reifen K28-Dimer hatten hier neben Hrd1p auch Cue1p, Ubc7p, Ubc1p, Der1p und Yos9p einen Einfluss auf die Toxizität von K28 $\alpha$ . Die Tatsache, dass keine der betreffenden Nullmutanten eine vollständige Resistenz entwickelte deutet auf einen alternativen Weg von K28 $\alpha$  hin, der ERAD-unabhängig verläuft. Wie bei dem internalisierten  $\alpha/\beta$ -Toxin spielt beim ER-Export der  $\alpha$ -Untereinheit auch der CDC48-Komplex keine Rolle. Jedoch verdichteten sich die Hinweise auf eine stattfindende Polyubiquitinierung, auch wenn bislang kein direkter biochemischer Nachweis erbracht werden konnte. Beispielsweise zeigte ein Lysin-freies K28 $\alpha$ -Derivat einen erheblichen Toxizitätsverlust. Obwohl ein Einfluss cytosolischer und ER-luminaler Chaperone auf die Toxizität von K28 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte, kann keine Aussage über ihre Rolle am ER-Export getroffen werden, da diese auch am posttranslationalen ER-Import des Letalkonstruktes beteiligt sind.

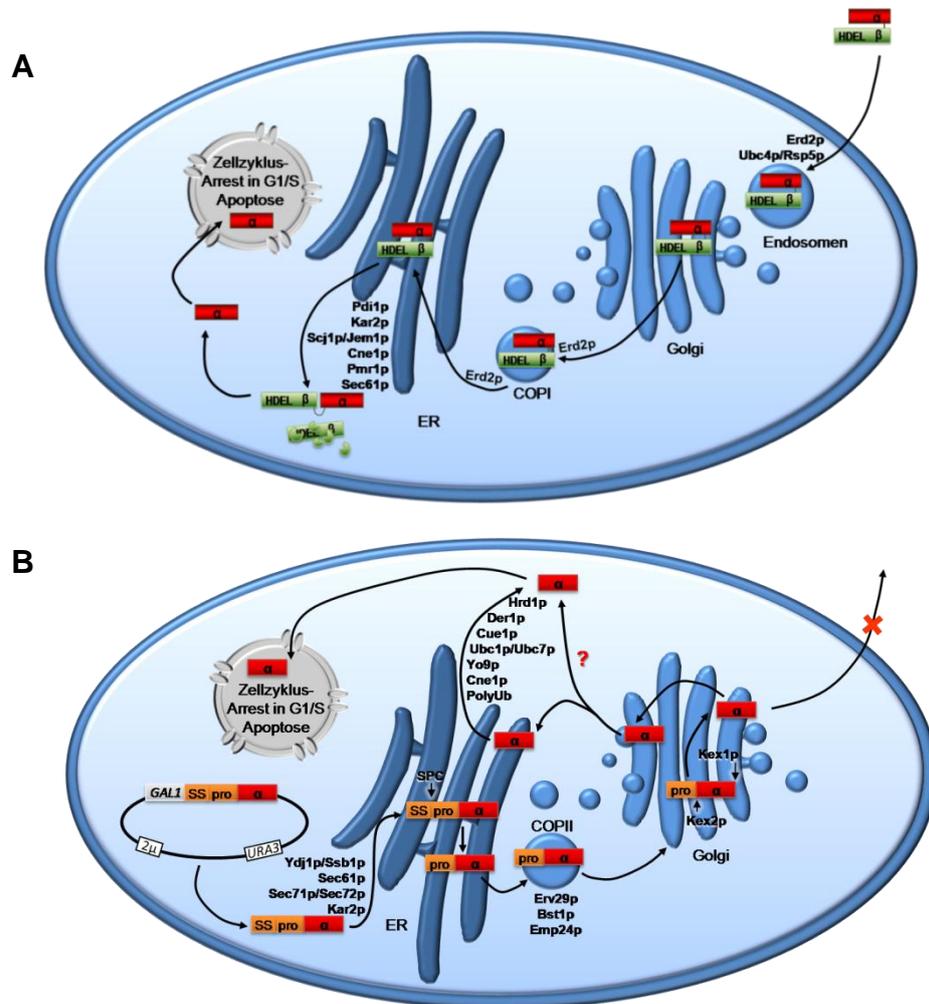


Abbildung 55:

**(A) Modell des retrograden Transportweges des reifen  $\alpha/\beta$  heterodimeren K28-Toxins nach Eintritt in die Zielzelle.** Nach Bindung an den HDEL-Rezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran und Rezeptor-Monoubiquitinierung wird K28 endozytotisch internalisiert. Erd2p vermittelt den retrograden Transport des Toxins bis in das ER. Die Dislokation in das Cytosol erfordert die Funktion der ER-Chaperone Kar2p, Scj1p/Jem1p, Pdi1p und Cne1p. Auch die Erhaltung der  $Ca^{2+}$ -Homöostase durch Pmr1p ist eine Voraussetzung für den ER-Export. Der Eintritt in das Cytosol erfolgt über den Sec61-Komplex. Eine Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten des HRD1-Komplexes oder des Ubiquitin-Proteasom-Systems konnte nicht nachgewiesen werden (Heiligenstein *et al.*, 2006; Heiligenstein, 2008; Eisfeld, 2001).

**(B) Modell des intrazellulären Transportweges von K28 $\alpha$  nach *in vivo*-Expression des Letalkonstruktes SS-pro- $\alpha^R$  im ER einer sensitiven Hefe.** Nach Galaktose-induzierter Expression von SS-pro- $\alpha^R$  wird das Toxinderivat mit Hilfe cytosolischer und ER-luminaler Chaperone über Sec61p posttranslational in das ER importiert. Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz (SS) durch den Signalpeptidase-Komplex (SPC) gelangt pro- $\alpha^R$  zunächst über COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat. Die Mitwirkung von Erv29p und Bst1p deutet bereits auf eine Beteiligung des ERAD-Weges, da beide Proteine den Transport fehlgefalteter ERAD-Substrate vermitteln. Im Golgi finden zwei Prozessierungsreaktionen durch die Proteasen Kex1p und Kex2p im späten Golgi-Kompartiment statt, wodurch der  $\alpha$ -C-terminale Argininrest und die pro-Region entfernt werden. Das Entfernen der pro-Region durch Kex2p ist Voraussetzung für die *in vivo*-Toxizität von K28 $\alpha$ . Ein Rücktransport zum ER konnte nicht direkt nachgewiesen werden, wohl aber die Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten. Während der HRD1-Komplex eine Rolle bei der K28 $\alpha$ -Toxizität spielt, scheint der CDC48-Komplex nicht involviert zu sein. Vieles deutet jedoch auf eine Polyubiquitinierung der K28 $\alpha$ -Untereinheit hin. Ein entsprechendes Lysin-freies Derivat besaß kaum noch Aktivität.

Nach intrazellulärer Expression von K28 $\alpha$  unterscheidet sich der Weg vom ER in das Cytosol in einigen Punkten wesentlich von dem retrograden Weg, den das Toxin natürlicherweise nutzt. Auf einmal scheinen ERAD-Komponenten und das Ubiquitin-Proteasom-System eine zentrale Rolle für den ER-Export zu spielen, obwohl die Toxizität des reifen Toxins auch in Abwesenheit dieser Proteine unbeeinträchtigt war (Heiligenstein *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis lässt Skepsis an den Ergebnissen von Publikationen aufkommen, die mit Hilfe von im ER exprimierten Toxinvarianten die zellulären Mechanismen der ER/Cytosol-Translokation mikrobieller A/B-Toxine untersuchen. In vielen Fällen wurde dieser Mechanismus anhand artifizierlicher Systeme analysiert, indem (wie in dieser Arbeit) künstliche ERAD-Substrate in Hefe- oder Säugerzellen überexprimiert wurden (Hampton *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2002; Nakatsukasa *et al.*, 2008). Es ist folglich nicht auszuschließen, dass die zelluläre Antwort, die infolge der Akkumulation dieser exprimierten Proteine induziert wird, nicht in allen Punkten derjenigen entspricht, die natürlicherweise eine Rolle spielt.

### **Einfluss der UPR auf die Toxizität von K28 $\alpha$**

ER-Stress führt zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER. Die Zelle hält zwei Antworten bereit, um diesem Prozess entgegen zu wirken. Einerseits sorgt der ERAD-Mechanismus für die Beseitigung der fehlgefalteten Proteine durch deren proteasomalen Abbau im Cytosol, auf der anderen Seite wird die „Unfolded protein response“ (UPR) ausgelöst, um die Faltungskapazitäten der Zelle zu verstärken und zugleich die Anhäufung weiterer fehlgefalteter Proteine zu vermeiden. Beide Signalwege werden eng koordiniert und sind voneinander abhängig. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass die Degradierungsrate von CPY\*, einem ER-luminalen ERAD-Substrat, in Zellen mit UPR-Defekt, z.B. einer *Ure1*-Mutante, eingeschränkt ist (Casagrande *et al.*, 2000). Diese Beobachtung impliziert, dass eine

weitere Funktion der UPR in der Verstärkung der Degradierungskapazität von ERAD liegt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Degradierungsrate fehlgefalteter Proteine durch ERAD beachtlich ansteigt, wenn die UPR durch Expression von Hac1p ausgelöst wird (Travers *et al.*, 2000). Einen limitierenden Schritt bei der Degradation glykosylierter ERAD-Substrate stellt die Prozessierung des N-Glykanrestes dar (Jakob *et al.*, 1998), der schließlich als Erkennungssignal für ER-luminale Chaperone dient. Travers und Mitarbeiter (2000) fanden heraus, dass die Expression des Gens, das für die verantwortliche Glykosylase Mns1p kodiert, durch UPR-Aktivierung angeschaltet wird. Umgekehrt hängt die UPR allerdings auch von ERAD ab. So kommt es zu einer konstitutiven UPR-Reaktion, wenn wichtige ERAD-Komponenten ausfallen und die Lebensfähigkeit einer *Aire1*-Mutante wird durch die Deletion von *HRD1*, *HRD3* oder *DER1* stark beeinträchtigt (Travers *et al.*, 2000). Folglich besitzen ERAD und UPR teilweise überlappende Funktionen, die durch Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER angeschaltet werden und letzten Endes das Entfernen dieser Proteine bewirken, sei es direkt durch deren Abbau oder durch Hochregulierung der Chaperon- und ERAD-Aktivität. In *S. cerevisiae* wird ER-Stress durch die Proteinkinase und Endoribonuklease Ire1p erkannt, die daraufhin ein Signal in den Zellkern leitet und die UPR anschaltet (Shamu und Walter, 1996; Nikawa und Yamashita, 1992; Cox *et al.*, 1993). In Folge von Proteinakkumulationen im ER bildet Ire1p Oligomere und wird durch andere Ire1p-Moleküle phosphoryliert. Beide Vorgänge sind essenziell für die Aktivierung der UPR. Die Oligomerisierung einer überexprimierten verkürzten Form von Ire1p und dem Wildtypprotein konnte von Shamu und Walter (1996) biochemisch bestätigt werden. Nach dieser Aktivierung spleißt die Endonukleaseaktivität von Ire1p ein kleines Intron am 3'-Ende der mRNA des bZIP-Transkriptionsfaktors Hac1p (Cox und Walter, 1996). Anhand von *in vitro* Rekonstitutionsexperimenten konnte die Gruppe von Walter nachweisen, dass die aufgereinigte Effektor-domäne von Ire1p *in vitro*

synthetisierte *HAC1* mRNA präzise spalten kann und dass eine aufgereinigte tRNA-Ligase aus Hefe die beiden Exonenden ligiert. Daraus resultiert eine 1,2 kb große mRNA (Sidrauski und Walter, 1997), die im Gegensatz zu der ungespleißten 1,4 kb mRNA *in vivo* translatiert wird (Cox und Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1997). Der als Antwort auf ER-Stress translatierte Transkriptionsfaktor Hac1p ist in der Lage, UPR-Elemente (UPRE) in der Promotorregion verschiedener Gene *in vitro* zu binden und die Transkription der Zielgene *in vivo* zu aktivieren (Mori *et al.*, 1996). Travers und Mitarbeiter (2000) identifizierten in einer genomweiten „Microarray“-Analyse 208 Zielgene der UPR. Etwa die Hälfte dieser Genprodukte spielt eine Rolle im Sekretionsweg. Neben Chaperonen und ERAD-Komponenten führt die Induktion der UPR zur Hochregulierung von Proteinen, die an der ER-Translokation, Glykosylierung, am Vesikeltransport oder an der vakuolären Sortierung beteiligt sind. Selbst die Zellwandbiosynthese und der Lipidstoffwechsel sind durch UPR betroffen (Travers *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte für viele dieser hochregulierten Proteine bereits eine Beteiligung am intrazellulären Transport und der Toxizität von K28 nachgewiesen werden. Neben Proteinen, die essenziell für den posttranslationalen ER-Import und die Abspaltung der Signalsequenz von K28 $\alpha$  oder K28p<sub>ptox</sub> sind (Sec61p, Sec71p, Sec72p, Spc2p) wurden die ER-luminalen Chaperone Kar2p, Jem1p und Scj1p, Lhs1p und die Proteindisulfidisomerase Pdi1p hochreguliert. Betroffen sind zudem Komponenten des ERAD-Weges wie Hrd1p, Hrd3p, Der1p, und Ubc7p (auch das DUB Doa4p wird bei UPR hochreguliert), deren Funktionen für den ER-Export von K28 $\alpha$  nach intrazellulärer Expression wichtig sind. Darüber hinaus werden als Antwort auf ER-Stress Proteine verstärkt exprimiert, die am Golgi-ER-Transport bzw. am retrograden Transportweg beteiligt sind, darunter auch der HDEL-Rezeptor Erd2p, der den retrograden Transport des K28-Toxins in das ER vermittelt (Eisfeld *et al.*, 2000). Auch Apl3p, eine Untereinheit des Adapter-Protein-Komplexes AP-2, der Homologie zum AP-2-Komplex im Säuger aufweist, der an der Bildung von Clathrin-bedeckten Vesikeln beteiligt ist (Schmid, 1997), wird im Verlauf der UPR hochreguliert.

Eine  $\Delta ap13$ -Mutante zeigte im Agardiffusionstest fast vollständige Resistenz gegen K28-Toxin (Heiligenstein, 2008). Ausgehend von der Beobachtung, dass K28( $\alpha$ ) auf seiner intrazellulären Route eine Vielzahl von Proteinen benötigt, die als Folge von zellulärem Stress hochreguliert werden, könnte vermutet werden, dass eine Strategie des Toxins darin besteht, ER-Stress bzw. die UPR zu induzieren, um die Effizienz seiner Retrotranslokation und folglich seiner Toxizität zu erhöhen. ER-Stress wird ausgelöst, wenn fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen akkumulieren (Shamu und Walter, 1996; Cox *et al.*, 1993). Bereits für andere A/B-Toxine wurde beschrieben, dass sie sich im ER als fehlgefaltete Proteine tarnen (Hazes und Read, 1997). Dazu kommt, dass der ER-Export des K28-Dimers die Umwandlung in eine translokationskompetente Konformation erfordert. Die Proteindisulfid-isomerase Pdi1p scheint an dieser teilweisen Entfaltung maßgeblich beteiligt zu sein (Heiligenstein *et al.*, 2006). Inwieweit eine fehlende UPR einen Einfluss auf die Toxizität von K28 $\alpha$  hat, wurde in dieser Arbeit untersucht, indem das Letalkonstrukt in einer  $\Delta hac1$ -Mutante exprimiert wurde, die nicht mehr in der Lage ist, UPR-Zielgene anzuschalten. In der Tat zeigte sich, dass K28 $\alpha$  deutlich an Toxizität einbüßte. Wurde hingegen gleichzeitig eine bereits gespleißte *HAC1*-Variante von einem eingebrachten Plasmid exprimiert, wurde dieser Effekt aufgehoben und es bildete sich ein Selbstkillerphänotyp. Folglich tötet K28 $\alpha$  seine Zielzelle effizienter ab, wenn UPR ausgelöst wird, was sich auf die gesteigerte Expression der oben aufgeführten Proteine zurückführen lässt. Folglich wäre die Induktion dieser Stressantwort aus der Sicht des Toxins durchaus sinnvoll. Es ist nicht einzusehen, warum ein A/B-Toxin die UPR, beispielsweise durch Verhindern der Spleißreaktion der *HAC1*-mRNA, inhibieren sollte, wie es von Parikh *et al.* (2008) für das Pflanzentoxin Ricin postuliert wird, da sie dadurch ihren eigenen ER-Export hemmen würden. Ob K28 aktiv UPR auslöst oder der Sensitivitätsverlust der  $\Delta hac1$ -Mutante eher auf einem zufälligen Nebeneffekt beruht, konnte in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr untersucht werden. In dieser Hinsicht wäre ein

biochemischer Nachweis mittels Northern Blot sinnvoll, der zeigt, ob die Menge an gespleißter *HAC1*-mRNA nach Toxinbehandlung zunimmt. Alternativ könnte die Hochregulation von UPR-Zielgenen wie *KAR2* oder *PDI1* im Northern Blot oder im Western Blot analysiert werden.

### **Die Rolle des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc4p**

Im Rahmen der K28-Ubiquitinierung wurde ein weiteres Ubiquitin-konjugierendes Enzym, Ubc4p, untersucht, das bislang nicht mit einer Ubiquitinierung von ERAD-Substraten in Verbindung gebracht wird, sondern vielmehr die Ubiquitin-unabhängige proteasomale Degradation vieler kurzlebiger Proteine vermittelt (Sommer und Seufert, 1992). Untersuchungen von Heiligenstein belegen, dass dieses E2-Enzym an der Toxininternalisierung beteiligt ist. Eine entsprechende *ubc4*-Mutante wies eine deutlich eingeschränkte Toxinsensitivität auf und zeigte bei gleichzeitiger Deletion von *UBC6* oder *UBC7* eine vollständige Resistenz gegen von außen appliziertes K28-Toxin (Eisfeld, 2001). Ein fehlendes Signal in der Vesikelfraktion belegte in weiterführenden Zellfraktionierungs-experimenten, dass das reife K28-Heterodimer von einer *ubc4*-Mutante nicht mehr endozytiert wird und demzufolge auf Ebene der Plasmamembran akkumuliert. Im Gegensatz dazu war K28 im isogenen Wildtyp in der cytosolischen Fraktion nachweisbar. Hatakeyama *et al.* (1997) schrieben Ubc4p und der Ubiquitin-Ligase Rsp5p eine Funktion im Zuge der Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen zu. Daher wird davon ausgegangen, dass der Plasmamembranrezeptor von K28, Erd2p, einer Monoubiquitinierung durch Ubc4p/Rsp5p unterliegt, die die endozytotische Aufnahme des Rezeptor-Toxinkomplexes stimuliert. Da in Abwesenheit von Ubc4p bereits die Aufnahme von K28 blockiert war, konnte keine Aussage über eine mögliche Bedeutung von Ubc4p an der ER/Cytosol-Retrotranslokation von K28 getroffen werden. Hier stellte sich nun erneut die intrazelluläre Expression des K28 $\alpha$ -Letalkonstruktes als geeignetes Testsystem heraus, um Hinweise auf eine Beteiligung von

Ubc4p an der *in vivo* Toxizität von K28 $\alpha$  zu erhalten. Tatsächlich zeigte eine entsprechende  $\Delta ubc4$  Deletionsmutante Resistenz gegen K28 $\alpha$ . Man könnte spekulieren, dass Ubc4p eine bislang unbekannte Funktion in der Retrotranslokation innehat, die für die ER-Cytosol-Dislokation der  $\alpha$ -Untereinheit benötigt wird. Darüber hinaus wäre auch eine Rolle von Ubc4p für die eigentliche Toxizität von K28 $\alpha$  im Zellkern denkbar. Der Anaphase-fördernde Komplex (APC) stellt eine große E3-Ubiquitin-Ligase dar, die Zellzyklus-relevante Proteine durch Anheftung von Polyubiquitinketten für deren Abbau markiert und so für die Vervollständigung der Mitose unentbehrlich ist (Peters, 2006; Thornton und Toczyski, 2006). Im Säuger nutzt der APC *in vitro* E2-Enzyme der Ubc4/5 und E2-C Familien (Yu *et al.*, 1996; Summer *et al.*, 2008). Rodigro-Brenni und Morgan (2007) identifizierten in einem *in vitro*-„Screening“ aller E2s von *S. cerevisiae* die beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc4p und Ubc1p als Schlüsselpartner des APC. Während Ubc4p die Monoubiquitinierung verschiedener APC-Zielproteine katalysiert, vermittelt Ubc1p deren Polyubiquitinierung. Durch den anschließenden proteasomalen Abbau der APC-Zielproteine, darunter Securin und mitotische Cycline, wird der Übergang in die Anaphase und damit das Ende der Mitose eingeleitet. Zellen, denen Ubc4p fehlt, weisen Defekte in der Disassemblierung des Spindelapparates auf und arretieren in der Metaphase. Phänotypisch besitzen sie einen einfachen DNA-Gehalt und eine kurze prä-Anaphase-Spindel am Knospenansatz. Hefen, die mit K28-Toxin behandelt wurden, weisen ebenfalls einen präreplikativen DNA-Gehalt (1N) auf und arretieren mit einer mittelgroßen Knospe ohne eingewanderten Zellkern (Schmitt *et al.*, 1996; Reiter, 2004). Möglicherweise handelt es sich bei Ubc4p selbst oder bei einem bzw. mehreren seiner Substrate um ein direktes Ziel des K28-Toxins.

## Einfluss von Calcium auf die K28-Toxizität

Der vorübergehende Anstieg von freien Calciumionen im Cytosol reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proteinreifung und –sekretion, intrazellulären Transport, Zellzyklusprogression, Genexpression, Knospung und Apoptose (Cunningham und Fink, 1994, Ohya *et al.*, 1986). In der Hefe spielt die Vakuole eine zentrale Rolle für die Erhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Vergleichbar mit dem Endoplasmatischen/Sarcoplasmatischen Retikulum in Säugerzellen speichert sie vermutlich mehr als 90% des gesamten zellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (Halachmi und Eilam, 1989). Die intrazellulären Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  werden mit Hilfe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter Vcx1p, Pmc1p und Pmr1p auf niedrigem Niveau gehalten. Durch diese Kontrolle wird die Funktion der Proteinphosphatase Calcineurin reguliert und ein effizientes  $\text{Ca}^{2+}$ -„Signaling“ gewährleistet (Cunningham und Fink, 1996). Ergebnisse von Heiligenstein deuteten bereits daraufhin, dass Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts im Sekretionsweg die K28-Toxizität verhindern. In Abwesenheit der P-Typ ATPase Pmr1p, die hauptsächlich im Golgi-Komplex, aber auch in weiteren sekretorischen Kompartimenten lokalisiert ist (Rudolph *et al.*, 1989; Antebi und Fink, 1992), bildeten Hefezellen eine Toxinresistenz aus und waren nicht in der Lage, K28 vom endosomalen Kompartiment zum Sekretionsweg zu dirigieren. Dieser Phänotyp ist allerdings reversibel und kann durch Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 40 mM aufgehoben werden. Die Erhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Sekretionsweg scheint folglich eine Voraussetzung für die *in vivo* Toxizität von K28 und dessen ER-Retrotranslokation zu sein (Heiligenstein *et al.*, 2006). Für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Toxinwirkung spricht auch die Beobachtung, dass K28 sensitive Hefen am effektivsten abgetötet werden, wenn dem Kulturmedium  $\text{CaCl}_2$  in einer Konzentration von 50 mM zugesetzt wird, wie auch eigene Studien zur Abtötung des sensitiven Stammes *S. cerevisiae* TM230 bestätigten. Überraschenderweise wurde nach intrazellulärer

Expression von K28 $\alpha$  im ER einer  $\Delta pmr1$ -Deletionsmutante kein signifikanter Phänotyp beobachtet, die Toxinsensitivität war nur unwesentlich reduziert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die Toxinresistenz einer  $\Delta pmr1$ -Mutante gegen exogen appliziertes Toxin bereits auf der Stufe der Endosomen manifestiert und K28 gar nicht erst in den Golgi-Apparat gelangt, wenn die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in diesem Kompartiment durch die Abwesenheit von Pmr1p zu gering ist. Um den Einfluss von  $Ca^{2+}$ -Ionen auf Toxinaktivität oder -transport besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit drei weitere Nullmutanten  $\Delta vcx1$ ,  $\Delta pmc1$  und  $\Delta yvc1$  auf Veränderungen in ihrer Toxinsensitivität getestet. Bei Vcx1p handelt es sich um einen vakuolären  $Ca^{2+}/H^+$ -Antiporter mit niedriger Affinität, der sehr schnell und mit hoher Kapazität  $Ca^{2+}$ -Ionen im Austausch gegen Protonen in die Vakuole transportiert und so die Ausbreitung von  $Ca^{2+}$ -Signalen in der Zelle abschwächt (Miseta *et al.*, 1999; Belde *et al.*, 1993; Pozos *et al.*, 1996; Cunningham und Fink, 1996). Die hoch-affine vakuoläre ATPase Pmc1p hilft Vcx1p, die Konzentration an freien  $Ca^{2+}$ -Ionen im Cytosol zu kontrollieren, indem sie diese Ionen ATP-abhängig in die Vakuole pumpt (Cunningham und Fink, 1994). Während die Deletion des *PMC1*-Genes nur eine schwache Sensitivitätsminderung bewirkte, resultierte der „Knockout“ von *VCX1* in einer vollständigen Resistenz gegenüber dem intrazellulär exprimierten K28-Letalkonstrukt. Beide Proteine, Pmc1p und Vcx1p, besitzen teilweise überlappende Funktionen, sie unterscheiden sich jedoch grundlegend in ihrer Antwort auf erhöhte cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen ( $Ca^{2+}$ -Stress): Pmc1p reagiert mit einer verstärkten  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in die Vakuole, wohingegen der  $Ca^{2+}$ -Transport durch Vcx1p inhibiert wird (Miseta *et al.*, 1999). Der Verlust dieses  $Ca^{2+}/H^+$ -Austauschers führt somit zu einem Defekt in der Anpassung an einen plötzlichen Anstieg der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Miseta und Mitarbeiter (1999) stellten die Hypothese auf, dass Vcx1p und Pmc1p konträre Funktionen in der  $Ca^{2+}$ -Homöostase besitzen. Liegt Vcx1p aktiv vor, transportiert es cytosolisches  $Ca^{2+}$  sehr schnell in die Vakuole und wirkt somit der Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -

Signalwege entgegen. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration extrazellulär an, wird Vcx1p durch die Wirkung von Calmodulin/Calcineurin inaktiviert, wodurch die Signaltransduktion verstärkt wird und andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter wie Pmc1p und Pmr1p aktiviert werden. Das erklärt zwar nicht den resistenten Phänotyp der  $\Delta\text{vcx1}$ -Nullmutante, es könnte jedoch die unveränderte Sekretion und Reifung des K28-Toxins in der  $\Delta\text{vcx1}$ -Mutante erklären, die vermutlich die Aktivität von Pmr1p erfordert. So konnte bereits gezeigt werden, dass in Mutanten, denen Pmr1p fehlt, die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Protease Kex2p im späten Golgi gestört ist, was die Sekretion anormaler Proteine zur Folge hat (Antebi und Fink, 1992; Cunningham und Fink, 1994). Die korrekte Reifung des K28-Toxinvorläufers hängt jedoch elementar von der Funktion dieser Endoprotease ab (Riffer *et al.*, 2002; Schmitt und Tipper, 1995). Darüber hinaus wurde die Bedeutung von Yvc1p auf die toxische Aktivität von K28 $\alpha$  untersucht. Dieses vakuoläre TRP-Kanal-Homolog katalysiert als Gegenspieler von Vcx1p die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Vakuole in das Cytosol. Weder nach *in vivo* Expression von SS-pro- $\alpha^R$ , noch nach exogener Toxinapplikation zeigte die  $\Delta\text{yvc1}$ -Mutante einen Sensitivitätsverlust. Da auch die Sekretion von aktivem K28 nicht beeinträchtigt war, scheint eine Erhöhung der vakuolären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration keinen negativen Einfluss auf die K28-Toxizität zu haben. Der signifikanteste Phänotyp konnte somit in Abwesenheit von Vcx1p beobachtet werden. Die  $\Delta\text{vcx1}$  Deletion bewirkte einen drastischen Aktivitätsverlust von K28 $\alpha$  nach *in vivo* Expression des Letalkonstruktes, nicht jedoch nach exogener Toxinzugabe. Da Vcx1p den einzigen in dieser Arbeit getesteten Transporter darstellt, der gleichzeitig Protonen in das Cytosol transportiert, wäre denkbar, dass der Phänotyp auf einen sekundären Effekt zurückzuführen ist, der auf einer verstärkten Ansäuerung der Vakuole beruhen könnte. Da alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter im ER synthetisiert werden und die Sortierung zur Vakuole über den Golgi-Apparat erfolgt, ist zudem davon auszugehen, dass in Gegenwart von Vcx1p ein Teil der Moleküle bereits im Sekretionsweg aktiv ist und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das ER transportiert.

Bei Verlust von Vcx1p würde diese Funktion wegfallen, was zu einem reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt führen würde. Im ER befinden sich eine Reihe  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Chaperone, zu denen neben Calnexin auch Kar2p/BiP zählt.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stimulieren die Autophosphorylierung des Hsp70-Chaperons Kar2p, wodurch dessen Protein-bindende Eigenschaften modifiziert werden. Eine verringerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER verhindert beispielsweise die Bindung von BiP an die  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (Suzuki *et al.*, 1991). Da die Funktion von Kar2p einen zentralen Schritt beim posttranslationalen ER-Import von K28 $\alpha$  beihaltet, könnte die Toxinresistenz der  $\Delta\text{vcx1}$ -Mutante auf einen gestörten ER-Import von K28 $\alpha$  zurückzuführen sein. Wäre der ER-Import generell gestört, sollte jedoch auch die Sekretion des K28-Toxins beeinträchtigt sein, was allerdings nicht der Fall war. Darüber hinaus wäre denkbar, dass durch die veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ - oder pH-Bedingungen im Cytosol eine Konformationsänderung von K28 $\alpha$  hervorgerufen wird, die entweder eine schnelle Degradation bewirkt oder den ER-Import verhindert. Es ist nicht auszuschließen, dass der Toxinvorläufer weniger anfällig auf solche Änderungen reagiert.

### **Proteomanalyse einer K28-behandelten Hefe**

Die gezielte Untersuchung ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten auf Veränderungen in ihrer Toxinsensitivität diene der Aufklärung des intrazellulären Transportes von K28 $\alpha$ . Zusätzlich sollte die Proteomanalyse eines mit K28-Toxin behandelten sensitiven Hefestammes Einblicke in die Wirtszellantwort liefern, um bestenfalls neue Hinweise auf die Toxinwirkung zu erhalten. Nachdem in Voruntersuchungen die optimalen Testbedingungen ermittelt worden waren, wurde der K28-sensitive Hefestamm *S. cerevisiae* TM230 fünf Stunden mit aktivem K28-Toxinkonzentrat behandelt. Zu diesem Zeitpunkt kam es zu einer deutlichen Reduktion der Gesamt- und Lebendzellzahl. Als Negativkontrolle diene hitzeinaktiviertes Toxin

derselben Charge. Zur statistischen Absicherung wurden jeweils vier parallele Ansätze mit aktivem oder inaktiviertem Toxin inkubiert. Entsprechende Zelllysate wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und DIGE analysiert und „Proteinspots“, deren Expressionsstärke nach der Toxinbehandlung im Vergleich zur Negativkontrolle um das 1,5-Fache erhöht oder vermindert war, wurden nach Trypsinverdau mittels MALDI MS/MS und Datenbankabgleich identifiziert. Von 32 Proteinen, deren Expressionsmuster als Antwort auf das K28-Toxin verändert war, konnten lediglich sieben identifiziert werden. Zusätzlich gelang es, alleine durch Vergleich der „Spot“-Intensitäten zweier Coomassiegefärbter Gele, acht weitere Proteine zu finden, die als Antwort auf K28-Behandlung eine erhöhte oder erniedrigte Expressionsstärke aufwiesen. Obwohl der „Proteinscore“ nach Datenbankabgleich der erhaltenen „Proteinpeaks“ bei unter 40% lag und das Ergebnis folglich mit Vorsicht zu betrachten ist, stimmten sowohl der pI-Wert als auch die Molekülgröße der betreffenden „Spots“ im Gel mit den vorhergesagten Größen überein, so dass drei dieser Proteine mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden konnten: Vma13p, Pho85p und Rhb1p. Nach Toxinbehandlung war die Konzentration eines kleinen Hitzeschockproteins (sHsp) in der Zelle erhöht. Dieses cytosolische Chaperon Hsp26p ist unter normalen Bedingungen in der Zelle nicht detektierbar, wird jedoch generell als Antwort auf zellulären Stress (z.B. durch Hitze-/Salzschock, Zellzyklusarrest, Stickstoff-/Kohlenstoffmangel oder oxidativen Stress) sehr stark exprimiert und verhindert durch Bindung denaturierter Proteine die Bildung irreversibler Proteinaggregate (Haslbeck *et al.*, 2005). Eine Hochregulierung von Hsp26p und weiteren Hitzeschockproteinen konnte in *S. cerevisiae* auch als Antwort auf Inkubation mit PMKT, dem Killertoxin aus *Pichia membranifaciens*, beobachtet werden. Laut „Microarray“-Daten und quantitativer „Real-time“ PCR war die Expression von Hsp26p um das 13-fache erhöht (Santos *et al.*, 2005). Ahner und Mitarbeiter beobachteten darüber hinaus eine reduzierte Degradation des ERAD-L-Substrates CFTR in  $\Delta hsp26$ -Zellen im Vergleich zum isogenen Wildtyp.

Mit Hilfe eines weiteren Experiments konnte gezeigt werden, dass dieses sHsp zwischen Wildtyp- und mutierter Variante dieses integralen Membranproteins unterscheiden kann, da  $\alpha$ -Kristallin (die hochkonservierte Domäne aller sHsps) in Säugerzellen ausschließlich die Degradation der mutierten CFTR-Variante ( $\Delta F508$ -CFTR) steigert (Ahner *et al.*, 2005). Abhängig von der Konformation des Zielproteins katalysieren Hsps die Proteinfaltung oder Degradation ihrer Substrate (Ellgaard and Helenius, 2003; Fewell *et al.*, 2001). Da die Sensitivität gegen K28 $\alpha$  in Abwesenheit von Hsp26p vermindert war, scheint dieses Chaperon für die Aktivität von K28 $\alpha$  von Bedeutung zu sein. Einerseits könnte es die Faltung des Toxins im Cytosol unterstützen, um dessen posttranslationalen ER-Import zu erleichtern oder es ermöglicht eine schnelle Rückfaltung von K28 $\alpha$  nach dessen ER-Export. Durch eine solche Reaktion würde K28 im Cytosol stabilisiert werden und ein Großteil der Toxinmoleküle könnte der proteasomalen Degradation entgehen. Eine Hochregulierung der Hsp26-Aktivität dient somit nicht nur dem Schutz der Zelle, sondern erleichtert möglicherweise zugleich die Toxinwirkung von K28.

Die Analyse der Transkriptionsantwort auf Behandlung mit dem Hefetoxin PMKT ergab, dass 13 Gene, deren Genprodukte am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind, in *S. cerevisiae* hochreguliert wurden (Santos *et al.*, 2005). Unter den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteinen befanden sich ebenfalls fünf Enzyme mit wichtigen Funktionen während der Glykolyse/Gluconeogenese oder alkoholischer Fermentation (Tdh3p/GAPDH, Eno1p und Eno2p, Pdc1p, Adh1p). Das glykolytische Enzym GAPDH phosphoryliert während der Glykolyse Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Almeida *et al.* (2007) zeigten, dass GAPDH ein wichtiger Regulator der Apoptose in Hefe ist. Bei Induktion der Apoptose durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterliegt GAPDH nach seiner Modifikation durch die kovalente Anheftung von Stickstoffmonoxid (NO) einer proteolytischen Inaktivierung und wird in den Zellkern transportiert. Eine Hemmung der NO-Produktion apoptotischer Zellen führt hingegen zu einer Stabilisierung von GAPDH

und einer reduzierten ROS-Akkumulation – die Zellen überleben. Es wurde spekuliert, dass die natürlicherweise erfolgende GAPDH-Inaktivierung den Kohlenhydratstoffwechsel von der Glykolyse zum Pentosephosphatweg umlenkt. (Ralser *et al.*, 2007; Shenton und Grant, 2003). Shenton und Grant zeigten, dass verschiedene Zielproteine als Antwort auf oxidativen Stress posttranslational modifiziert und dadurch inaktiviert werden. Neben Proteinen, die an Zellzykluskontrolle, Proteindegradation und Hitzeschockantwort beteiligt sind, unterliegen glykolytische Proteine wie Tdh3p, Eno2p und Adh1p, deren Expression auch nach K28-Behandlung verändert war, dieser Modifikation. Als Folge kommt es zu einem Aktivitätsverlust dieser glykolytischen Enzyme um mindestens 70%, was eine Umprogrammierung des Stoffwechsels zur Folge hat. Die Umwandlung von Glukose zu Ethanol wird inhibiert und Glukoseäquivalente treten vermehrt in den Pentosephosphatweg ein (Shenton und Grant, 2003), wodurch verstärkt NADPH gebildet und das cytosolische NADPH/NADP<sup>+</sup>-Gleichgewicht aufrechterhalten wird. NADPH wirkt oxidativem Stress entgegen und schützt die Zelle vor Schädigungen durch ROS-Akkumulation (Jamieson, 1998). Für eine solche Zellschutzfunktion von GAPDH spricht auch, dass in Tumoren die Expression von GAPDH häufig erhöht ist (Revillion *et al.*, 2000; Rondinelli *et al.*, 1997). Colell und Mitarbeiter schreiben GAPDH zudem eine wichtige Regulatorfunktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes zu. So bewahrt GAPDH Zellen, deren mitochondrielle Außenmembran durch Apoptoseinduktion permeabilisiert wurde, vor dem Zelltod. Dieser Zellschutz wird durch drei Mechanismen gewährleistet. Neben der Induktion der Glykolyse erhöht dieses Enzym den ATP-Gehalt, der die nötige Energie zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials liefert und so die Funktion der Mitochondrien schützt. Zugleich trägt GAPDH im Zellkern von Säugerzellen zur Transkription verschiedener Zielproteine bei und ist auf diese Weise an Zellzyklusregulation (Carujo *et al.*, 2006) und DNA-Reparatur (Meyer-Siegler *et al.*, 1991) beteiligt. Colell *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass GAPDH darüber hinaus die Expression von Atg12p induziert, wodurch defekte Mitochondrien durch

Mitophagie entfernt werden und die betroffenen Zellen überleben können. Eine Hochregulation von GAPDH und weiteren glykolytischen Enzymen wie Eno1p und Adh1p repräsentiert somit einen Schutzmechanismus der Zelle, der der Apoptose, die durch geringe Konzentrationen an K28-Toxin ausgelöst wird (Reiter *et al.*, 2005), entgegenwirkt. Im Gegensatz zu Tdh3p und Eno1p wird Eno2p bei Wachstum auf Glukose verstärkt exprimiert (Cohen *et al.*, 1986). Dadurch erklärt sich das unterschiedliche Expressionsmuster dieser beiden Enolasen nach K28-Behandlung. Obwohl die Pyruvat-decarboxylase Pdc1p bisher nicht im Zusammenhang einer schützenden Zellantwort beschrieben wurde, ist eine Beteiligung durchaus denkbar, da Pdc1p wie Adh1p eine essenzielle Rolle bei der alkoholischen Gärung zukommt.

Vermutlich dient die verstärkte Expression von Vma13p ebenfalls dem Schutz der Zelle vor Abtötung durch K28. Heiligenstein konnte im Rahmen eines „Mutantenscreenings“ jeweils vier Untereinheiten der V0- und der V1-Domäne der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) identifizieren, deren Abwesenheit zu einer Hypersensitivität gegen exogen appliziertes K28 führt. Unter diesen supersensitiven Stämmen befand sich auch ein Deletionsstamm, dem das *VMA13*-Gen fehlte. Eine Hefe ohne diese Untereinheit der katalytischen V1-Domäne der V-ATPase wies eine fast 10-fach erhöhte Toxinsensitivität auf (Heiligenstein, 2008). Dieser Phänotyp lässt sich darauf zurückführen, dass Zellen, denen die V-ATPase fehlt, einen Defekt in der Sortierung endozytotisch aufgenommener Proteine zur Vakuole aufweisen. Anhand eines fluoreszierenden Endozytosemarkers (FM 4-64) konnte demonstriert werden, dass dieser Farbstoff in Mutanten mit Defekt in der V-ATPase-Funktion nur unzureichend internalisiert wird und in Endosomen akkumuliert, während er in Wildtypzellen in der Vakuolenmembran detektiert werden konnte (Perzov *et al.*, 2002). Eine Überexpression von Vma13p deutet auf eine erhöhte Anzahl von V-ATPase-Molekülen im Sekretionsweg hin. Infolgedessen sollte das K28-Toxin nach Eintritt über Endozytose verstärkt zur Vakuole transportiert und abgebaut werden.

Bei Pho85p handelt es sich um eine Zyklin-abhängige Kinase, die an der G1-Zellzyklusprogression, der Knospenbildung, am Actincytoskelett und an der Genexpression beteiligt ist (Huang *et al.*, 2007). Generell ist Pho85p aktiv, wenn die Umweltbedingungen günstig sind (Carroll *et al.*, 2001). Unter anderem aktiviert Pho85p START-spezifische Gene, darunter die G1-Cycline *CLN1*, *CLN2*, *PCL1* und *PCL2* und ist so am Übergang in die S-Phase beteiligt (Simon *et al.*, 2001). Im Falle eines G1-Arrests durch DNA-Schäden phosphoryliert Pho85p Zielproteine und vermittelt so die Aufhebung des Arrests. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte eine  $\Delta$ *pho85*-Nullmutante im Agardiffusionstest eine um 80% verringerte Toxinsensitivität gegen K28 (Reiter, 2004). Da K28 einen Zellzyklus-Arrest in G1/S induziert (Schmitt *et al.*, 1996), kann davon ausgegangen werden, dass Pho85p bei der Vermittlung der Toxinwirkung eine Rolle spielt. Auch hier ist die Hochregulation von Pho85p als Antwort auf K28-Behandlung möglicherweise Teil eines zellulären Schutzmechanismus, der dem G1-Arrest entgegenwirkt, um den Zellzyklus erneut in Gang zu bringen.

Normalerweise führen DNA-Schädigungen zur Verlangsamung des Zellzyklus am S-Phase-Kontrollpunkt, um der Zelle Zeit für die notwendige Reparatur zu lassen. Die Deletion der beiden Gene *MRE11* und *RAD50*, die für Untereinheiten des XRS2-Komplexes kodieren, erhöht die Anfälligkeit für DNA-Läsionen, führt zu einem DNA-Reparaturdefekt, zu Telomerverkürzung und beeinträchtigt die meiotische Rekombination (Haber, 1998). D'Amours und Jackson (2008) schreiben diesem Komplex darüber hinaus eine Funktion bei der Initiation des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes zu. Laut ihrer Studie treten XRS2-defekte Hefen mit replikativem Stress schneller in die S-Phase ein als der Wildtyp. Zudem weisen solche Mutanten einen Defekt in der Verlängerung der Mitosespindel auf. Als Folge reagieren die Zellen überempfindlich auf replikativen Stress und sterben. Eine verminderte Expressionsrate von Rad50p würde folglich einen schnelleren Übergang in die S-Phase verursachen und so einem G1/S-Phase Arrest, wie er durch K28 induziert wird, entgegenwirken. Zugleich käme es allerdings zu einer Überempfindlichkeit gegen DNA-Schäden.

Ferner war die Rheb-verwandte GTPase Rhb1p nach K28-Zugabe herunterreguliert. Während Rhb1p in *Schizosaccharomyces pombe* zwei Komplexe (Tor1 und Tor2) aktiviert, die den Säugerkomplexen mTORC1 und 2 entsprechen und an der zellulären Stressantwort bzw. an Wachstum und Zellzyklusprogression beteiligt sind, scheint Rhb1p in *Saccharomyces cerevisiae* keine Tor-Proteine zu regulieren (Aspuria und Tamanoi, 2004). Die genaue Funktion dieses Proteins ist somit noch nicht geklärt.

Um das Ergebnis der Proteomanalyse kurz zusammenzufassen, kann festgehalten werden, dass das veränderte Expressionsmuster als Antwort auf die Behandlung einer sensitiven Hefe mit K28-Toxin hauptsächlich auf einen zellulären Schutzmechanismus zurückzuführen ist, der die Zelle vor Apoptose bewahren soll. Lediglich für Hsp26p und Pho85p konnte in Überlebens- und Wachstumstests eine direkte Beteiligung an der K28 $\alpha$ -Toxizität nachgewiesen werden.

## V Zusammenfassung

Das virale K28-Toxin aus *Saccharomyces cerevisiae* wird nach Prozessierung des Toxinvorläufers im Sekretionsweg als reifes  $\alpha/\beta$ -heterodimeres Toxin sezerniert und tötet sensitive Zielzellen in einem rezeptorvermittelten Prozess durch Induktion eines Zellzyklusarrestes und Inhibierung der DNA-Synthese. Nach endozytotischer Internalisierung durchläuft das Toxin den Sekretionsweg retrograd und gelangt über das Sec61-Translokon unabhängig von klassischen ERAD-Komponenten aus dem ER in das Cytosol.

Anhand der intrazellulären Expression eines K28-Letalkonstruktes (SS-pro- $\alpha^R$ ), das in sensitiven Hefen einen Selbstkillerphänotyp induziert, wurde der Retrotranslokationsmechanismus im Detail charakterisiert. Durch Sensitivitätstests ausgewählter Deletionsmutanten wurden zelluläre Komponenten identifiziert, deren Funktionen für die *in vivo*-Toxizität von K28 $\alpha$  von Bedeutung sind.

Durch Detektion einer cytosolischen K28 $\alpha$ -Variante mittels „Pulse-Labeling“ im Hefezelllysat wurde nachgewiesen, dass der fehlende ER-Import dieser Variante für den Toxizitätsverlust verantwortlich ist, ohne hierbei eine Degradation von  $\alpha$  zu induzieren. Der Eintritt von SS-pro- $\alpha^R$  in den Sekretionsweg konnte indirekt durch dessen verminderte Aktivität nach Expression in Mutanten mit Defekten im posttranslationalen ER-Import, im Signalpeptidase-Komplex und in cytosolischen Chaperon-Mutanten bewiesen werden.

Die verringerte Sensitivität von  $\Delta bst1$ - und  $\Delta erv29$ -Mutanten, deren Genprodukte den COPII-abhängigen Golgi-Transport luminaler ERAD-Substrate vermitteln, zeigte, dass K28 $\alpha$  bis in den Golgi-Apparat gelangt und lieferte einen Hinweis auf die Beteiligung des ERAD-Weges an der ER/Cytosol-Dislokation.

Mittels Western-Analyse konnte das Entfernen der pro-Region durch die Aktivität der Endoprotease Kex2p im späten Golgi-Kompartiment nachgewiesen werden. Die Zerstörung der Kex2p-Schnittstelle und Expression von K28 $\alpha$  in  $\Delta kex2$ - und  $\Delta kex1$ -Mutanten verursachte einen Toxizitätsverlust, der die essenzielle Bedeutung dieser Prozessierungen untermauerte.

Im Gegensatz zu exogen appliziertem Toxin gelangt K28 $\alpha$  mit Hilfe des HRD1-Komplexes ins Cytosol. Die Abwesenheit der klassischen ERAD-Komponenten Hrd1p, Ubc1p, Ubc7p, Cue1p, Der1p, Yos9p und Cne1p führte zu einem Aktivitätsverlust von  $\alpha$ . Eine Beteiligung des CDC48-Komplexes konnte nicht bestätigt werden.

Wurde eine Polyubiquitinierung von K28 $\alpha$  durch Austausch der internen Lysinreste oder gleichzeitiger Überexpression einer Ubiquitinmutante, die keine Polyubiquitinketten bildet, verhindert, kam es zum Aktivitätsverlust von SS-pro- $\alpha^R$ . Umgekehrt wurde das Toxin in einer  $\Delta doa4$ -Mutante stabilisiert. Eine Ubiquitinierung von K28 $\alpha$  scheint somit für dessen Retrotranslokation wichtig zu sein, ein biochemischer Nachweis konnte bislang jedoch nicht erbracht werden.

Die Proteomanalyse einer K28-behandelten Hefe deutete auf die Aktivierung eines zellulären Schutzmechanismus hin, der dem apoptotischen Zelltod durch K28 entgegenwirkt.

## V Summary

K28, a viral A/B toxin produced by killer strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is secreted as an  $\alpha/\beta$  heterodimeric protein toxin after processing of its preprotoxin precursor within the yeast secretory pathway. It kills sensitive cells in a receptor mediated process by inducing a G1/S cell cycle arrest and inhibition of DNA synthesis. After endocytotic uptake, the toxin traverses the secretory pathway in reverse and enters the cytosol through the Sec61 complex of the ER membrane independently of ubiquitination and/or classical ERAD components.

In this study, toxin retrotranslocation from the ER into the cytosol has been characterized in detail by regulated expression of a lethal K28 $\alpha$ -toxin variant (SS-pro- $\alpha^R$ ) in the ER, which causes a selfkilling phenotype. Selected yeast deletion mutants were screened for toxin sensitivity in order to identify cellular components crucial for the *in vivo* toxicity of K28 $\alpha$ .

Detection of a pulse labeled K28 $\alpha$  variant in the yeast cell cytosol provided direct biochemical evidence that blockage of ER import prevents *in vivo* toxicity of K28 $\alpha$ . Entry of SS-pro- $\alpha^R$  into the yeast secretory pathway could be further verified by a significant decrease in toxicity after *in vivo* expression in mutants either defective in posttranslational ER import, in signalpeptidase complex components and/or in cytosolic chaperones.

Gene products of *BST1* and *ERV29* are involved in COPII-dependent anterograde transport of luminal ERAD substrates to the Golgi. Due to the fact that such mutants were phenotypically less sensitive, K28 $\alpha$  is likely to be transported to the Golgi apparatus before reentering the cytosol from the ER by using components of the ERAD quality control pathway.

*In vivo* removal of the pro region in SS-pro- $\alpha^R$  by endopeptidase Kex2p cleavage in a late Golgi compartment could be detected by Western analysis. Both disruption of the Kex2p cleavage site or expression of K28 $\alpha$  in the genetic background of a  $\Delta kex2$  and/or  $\Delta kex1$  null mutant caused a complete loss in toxicity, demonstrating the central importance of protoxin processing.

In contrast to the exogenously applied  $\alpha/\beta$  toxin, K28 $\alpha$  reaches the cytosol with the help of the HRD1 complex. Lack of classical ERAD components such as Hrd1p, Ubc1p, Ubc7p, Cue1p, Der1p, Yos9p and Cne1p was accompanied by a complete loss of K28 $\alpha$ -toxicity while CDC48 complex components were not involved in  $\alpha$ -retrotranslocation from the ER.

Preventing polyubiquitination of K28 $\alpha$  either by substitution of all internal lysine residues or by simultaneous overexpression of mutant ubiquitin, unable to form polyubiquitin chains, resulted in a significant decrease in the *in vivo* toxicity of SS-pro- $\alpha^R$ . Furthermore, K28 $\alpha$  has been stabilized in a  $\Delta doa4$  mutant. Therefore, ubiquitination of K28 $\alpha$  seems to be essential for its retrotranslocation, although a direct biochemical proof is still missing.

Proteome analysis of K28-treated yeast suggested activation of a cellular defense mechanism which counteracts apoptotic cell death induced by K28 toxin.

---

## VI Literaturverzeichnis

- Ahmed, A., Sesti, F., Ilan, N., Shih, T.M., Sturley, S.L and Goldstein, S.A. (1999):** A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell* 99, 283-291.
- Ahner, A., Nakatsukasa, K., Zhang, H., Frizzell, R.A. and Brodsky, J.L. (2007):** Small heat-shock proteins select  $\Delta$ F508-CTFR for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell* 18, 806-814.
- Almeida, B. et al. (2007):** NO-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci* 120, 3279-3288.
- Anderson, R.G.W. and Pathak, R.K. (1985):** Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell* 40, 635-643.
- Anderson, C., Straus, J.W. and Dudock, B.S. (1983):** Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Method Enzymol* 101, 635-644.
- Antebi, A. and Fink, G.R. (1992):** The yeast  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase homologue, *PMR1*, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* 3, 633-654.
- Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F. and Hauri, H.P. (1999):** The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol* 1, 330-334.
- Aricello, M., Rotilio, G. and Rossi, L. (2005):** Copper-dependent toxicity in SH SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochem Biophys Commun* 327, 454-459.
- Arnason, T. and Ellison, M.J. (1994):** Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* 14, 7876-7883.
- Aspuria, P.J. and Tamanoi, F. (2004):** The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal* 16, 1105-1112.
- Asubel, F.M. et al. (1995):** Current Protocols in Molecular Biology. Greene publishing Associates and Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

- Baboshina, O.V. and Haas, A.L. (1996):** Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2-EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem* 271, 2823-2831.
- Baker, T.S., Olson, N.H. and Fuller, S.D. (1999):** Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 862-922.
- Barlowe, C. (2000):** Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* 1, 371-377.
- Barlowe, C. and Schekman, R. (1993):** SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 347-349.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A. and Hampton, R.Y. (2001):** Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored Ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* 3, 24-29.
- Bays, N.W. and Randolph, Y.H. (2002):** Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol* 12, R366-R371.
- Bays, N.W., Wilhovsky, S., Goradia, A., Hodgkill-Harlow, K. and Hampton, R. (2001):** HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 12, 4114-4128.
- 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.
- Belde, P.J.M., Vossen, J.H., Borst-Pauwels, G.W.F.H. and Theuvsen, A.P.R. (1993):** Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 323, 113-118.
- Belden, W.J. and Barlowe, C. (1996):** Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem* 271, 26939-26946.
- Belden, W.J. and Barlowe, C. (2001):** Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* 294, 1528-1531.
- Bernardi, K.M., Forster, M.L., Lencer, W.I. and Tsai, B. (2008):** Derlin-1 facilitates the retro-translocation of cholera toxin. *Mol Biol Cell* 19, 877-884.

- Bevan, E.A. and Makower, M. (1963):** The physiological basis of the killer-character in yeast. *Proc Int Congr Genet* 11203.
- Bevan, E.A. and Somers, J.M. (1969):** Somatic segregation of the killer (k) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinants in yeast. *Genet Res* 14, 71-77.
- Bhamidipati, A., Denic, V., Quan, E.M. and Weissman, J.S. (2005):** Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell* 19, 741-751.
- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1996):** Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 15, 2069-2076.
- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1997):** Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 278, 1806-1809.
- Boone, C., Bussey, H., Greene, D., Thomas, D.Y., Vernet, T. (1986):** Yeast killer toxin: site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component. *Cell* 4, 105-113.
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T. and Craig, E.A. (1994):** Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 38, 1-17.
- 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.
- Bostian, K.A., Sturgeon, J.A. and Tipper, D.J. (1980):** Encapsulation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. *J Bacteriol* 143, 463-470.
- Botstein, D., Chervitz, S.A. and Cherry, J.M. (1997):** Yeast as a model organism. *Science* 277, 1259-1260.
- Bourbonnais, Y., Ash, J., Daigle, M. and Thomas, D.Y. (1993):** Isolation and characterization of *S. cerevisiae* mutants defective in somatostatin expression: cloning and functional role of a yeast gene encoding an aspartyl protease in precursor processing at monobasic cleavage sites. *EMBO J* 12, 285-294.
- Bradford, M (1976):** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

- Braun, B.C. et al. (1999):** The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1, 221-226.
- Breinig, F., Sendzig, T., Einfeld, K. and Schmitt, M.J. (2006):** Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3810-3815.
- Breinig, F., Tipper, D.J. and Schmitt, M.J. (2002):** Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* 108, 395-405.
- 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.
- Brenner, C. and Fuller, R.S. (1992):** Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 922-926.
- 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. and Schekman, R. (1993):** A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* 123, 1355-1363.
- Brodsky, J.L., Goeckeler, J. and Schekman, R. (1995):** BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9643-9646.
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, E.D., Goeckeler, 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.
- Bryant, N.J. and Boyd, A. (1993):** Immunolocalization of Kex2p-containing organelles from yeast demonstrates colocalization of three processing proteinases to a single Golgi compartment. *J Cell Sci* 106, 815-822.
- Bryant, N.J., Piper, R.C., Weisman, L.S. and Stevens, T.H. (1998):** Retrograde traffic out of the yeast vacuole to the TGN occurs via the prevacuolar/endosomal compartment. *J Cell Biol* 142, 651-663.

- Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998):** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Burnette, W.N. (1981):** "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacryamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Buschhorn, B.A., Kostova, Z., Medicherla, B. and Wolf, D.H. (2004):** A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett* 577, 422-426.
- Bussey, H. (1988):** Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast* 4, 17-26.
- Butler, A.R., White, J.H. and Stark, M.J.R. (1991):** Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J Gen Microbiol* 137, 1749-1757.
- Butler, E.T. and Chamberlin, M.J. (1982):** Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase I Isolation and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 257, 5772-5778.
- Caldwell, S.R., Hill, K.J. and Cooper, A.A. (2001):** Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem* 276, 23296-23303.
- Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C. (1988):** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, 2796-2801.
- Campbell, J.L. and Schekman, R. (1997):** Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum-derived COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 837-842.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M. and Douglas, M.G. (1992):** Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* 71, 1143-1155.
- Carlson, E.J., Pitonzo, D. and Skach, W.R. (2006):** p97 functions as an auxiliary factor to facilitate TM domain extraction during CFTR ER-associated degradation. *EMBO J* 25, 4557-4566.
- Carroll, A.S., Bishop, A.C., DeRisi, J.L., Shokat, K.M. and O'Shea, E.K. (2001):** Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12578-12583.

- Carujo, S. et al. (2006):** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. *Oncogene* 25, 4033-4042.
- Carvalho, P., Goder, V. and Rapoport, T.A. (2006):** Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126, 361-373.
- Casagrande, R. et al. (2000):** Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell* 5, 729-735.
- Chapman, R, Sidrauski, C. and Walter, P. (1998):** Intracellular signalling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 459-485.
- Chau, V. et al. (1989):** A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- 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 USA* 87, 308-12.
- Chen, L. and Madura, K. (2002):** Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol* 22, 4902-4913.
- Chirico, W.J., Waters, M.G. and Blobel, G. (1988):** 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810.
- Chung, C.H. and Baek, S.H. (1999):** Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 633-640.
- Cieplak, W. Jr., Messer, R.J., Konkel, M.E. and Grant, C.C. (1995):** Role of a potential endoplasmic reticulum retention sequence (RDEL) and the Golgi complex in the cytotoxic activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol Microbiol* 16, 789-800.
- Clerc, S. et al. (2009):** Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 184, 159-172.
- Cohen, R., Holland, J.P., Yokoi, T. and Holland, M.J. (1986):** Identification of a regulatory region that mediates glucose-dependent induction of the *Saccharomyces cerevisiae* enolase gene *ENO2*. *Mol Cell Biol* 6, 2287-2297.

- Colell, A. et al. (2007):** GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129, 983-997.
- Contreras, R. et al. (1982):** Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes. *Nucl Acids Res* 10, 6353-6362.
- Cooper, J.A. (1987):** Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105, 1473-1478.
- Cooper, A. and Bussey, H. (1989):** Characterization of the yeast *KEX1* gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Mol Cell Biol* 9, 2706-2714.
- Corbett, J.M. et al (1994):** Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 15, 1205-1211.
- Cox, J.S., Shamu, C.E. and Walter, P. (1993):** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197-1206.
- Cox, J.S. and Walter, P. (1996):** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87, 391-404.
- Craven, R.A., Egerton, M. and Stirling, C.J. (1996):** A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* 15, 2640-50.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1994):** Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMC1*, a homologue of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases. *J Cell Biol* 124, 351-363.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1996):** Calcineurin inhibits *VCX1*-dependent  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and induces  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2226-2237.
- Cyr, D.M., Lu, X. and Douglas, M.G. (1992):** Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. *J Biol Chem* 267, 20927-20931.
- Dai, R.M. and Li, C.C. (2001):** Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain –targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* 3, 740-744.

- D'Amours, D. and Jackson, S.P. (2008):** The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* 15, 2238-2249.
- Dean, N. and Pelham, H.R.B. (1990):** Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. *J Cell Biol* 111, 369-377.
- Deeks, E.D., Cook, J.P., Day, P.I., 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.
- Denic, V., Quan, E.M. and Weissman, J.S. (2006):** A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* 126, 349-359.
- Denis, V. and Cyert, M.S. (2002):** Internal Ca<sup>2+</sup> release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* 156, 29-34.
- Deshaies, R.J., Koch, B., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. and Schekman, R. (1988):** A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. and Shekman, R. (1991):** Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol* 10, 6024-6035.
- de Virgilio, M., Kitzmuller, C., Schwaiger, E., Klein, M., Kreibisch, G. and Ivessa, N.E. (1999):** Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. *Mol Biol Cell* 10, 4059-4073.
- Dinman, J.D., Icho, T. and Wickner, R.B. (1991):** A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 174-178.
- Dmochowska, A., Dignard, D., Henning, D., Thomas, D.Y. and Bussey, H. (1987):** Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell* 50, 573-584.
- Dominguez, M. et al. (1998):** gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COPI and II coatomer. *J Cell Biol* 140, 751-765.

- 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.
- Egel-Mitani, M., Flygenring, H.P. and Hansen, M.T. (1990):** A novel aspartyl protease allowing KEX2-independent MF alpha pheromone processing in yeast. *Yeast* 6, 127-137.
- 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.
- Eisfeld, K. (2001):** Endozytose und retrograder Proteintransport am Beispiel des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003):** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.
- Elrod-Erickson, M.J. and Kaiser, C.A. (1996):** Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell* 7, 1043-1058.
- El-Sherbeini, M. and Bostian, K.A. (1987):** Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 4293-4297.
- Feldheim, D., Yoshimura, K., Admon, A. and Schekman, R. (1993):** Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 4, 931-939.
- Feldheim, D. and Schekman, R. (1994):** Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol* 126, 935-943.
- Feng, Y., Jadhav, P., Rodighiero, C., Fujinaga, Y., Kirchhausen, T. and Lencer, W.I. (2004):** Retrograde transport of cholera toxin from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum requires the *trans*-Golgi network but not the Golgi apparatus in Exo2-treated cells. *EMBO Rep* 5, 596-601.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S. and Brodsky, J.L. (2001):** The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet.* 35, 149-191.

- Fichtner, L. et al. (2003):** Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol Microbiol* 49, 1297-1307.
- Finley, D. et al. (1994):** Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* 14, 5501-5509.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J, Volkwein, C. and Sommer, T. (2000):** A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 2, 379-384.
- Fujimura, T., Esteban, R., Esteban, L.M. and Wickner, R.B. (1990):** Portable encapsidation signal of the L-A double-stranded RNA virus of *S. cerevisiae*. *Cell* 62, 819-828.
- Fujinaga, Y. et al. (2003):** Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera toxin from the plasma membrane to the ER. *Mol Biol Cell* 14, 4783-4793.
- Fujita, M., Yoho-o, T. and Jigami, Y. (2006):** Inositol Deacylation by Bst1p is required for the quality control of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell* 17, 834-850.
- Fuller, R.S., Brake, A.J. and Thorner, J. (1989):** Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246, 482-486.
- Fuller, R.S., Brake, A.J. and Thorner, J. (1989):** Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1434-1438.
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. and Kobayashi, H. (2002):** Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 745-750.
- Gardner, R.G. et al. (2000):** Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling: transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* 151, 69-82.
- Gauss, R., Sommer, T. and Jarosch, E. (2006):** The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *EMBO J* 25, 1827-1835.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (1991):** Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* 7, 253-263.

- Gill, D.M. and Meren, R. (1978):** ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3050-3054.
- Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de la Cruz, F.J. and Römisch, K. (1999):** Export of a cystein-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol* 147, 1443-1456.
- Giniger, E., Barnum, S.M. and Ptashne, M. (1985):** Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A. and Finley, D. (1998):** The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-3162.
- Girod, A. et al. (1999):** Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nature Cell Biol* 1, 423-430.
- Gnann, A., Riordan, J.R., Wolf, D.H. (2004):** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation depends on the lectins Htm1p/EDEM and the cdc48 protein complex in yeast. *Mol Biol Cell* 15, 4125-4135.
- Görg et al (2000):** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Groll, M. et al. (1997):** Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Gunge, N. (1986):** Linear DNA killer plasmids from the yeast *Kluyveromyces*. *Yeast* 2, 153-162.
- Guida, L. (2007):** Sekretion und affinitätschromatografische Aufreinigung von FLAG- und FLAG/His-markierten Toxinvarianten von K28 in den Hefen *Kluyveromyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes.
- Guterman, A. and Glickman, M.H. (2004):** Deubiquitinating enzymes are INtrinsic to proteasome function. *Curr Protein Pept Sci* 5, 201-211.
- Haas, A., Warms, J., Hershko, A. and Rose, I. (1982):** Ubiquitin-activating enzyme: mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257, 2543-2548.

- Haber, J.E. (1998):** The many interfaces of Mre11p. *Cell* 95, 583-586.
- Halachmi, D. and Eilam, Y. (1989):** Cytosolic and vacuolar Ca<sup>2+</sup> concentrations in yeast cells measured with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett* 256, 55-61.
- Hampton, R.Y. (2002):** ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Cell Biol* 14, 476-482.
- Hampton, R.Y., Gardner, R.G., Rine, J. (1996):** Role of 26 S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell* 7, 2029-2044.
- Hanahan, D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hansen, W., Garcia, P.D. and Walter, P. (1986):** In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent post-translational translocation of the prepro- $\alpha$ -factor. *Cell* 45, 397-406.
- Hansen, W. and Walter, P. (1988):** Prepro-carboxypeptidase Y and a truncated form of pre-invertase, but not full-length pre-invertase, can be posttranslationally translocated across microsomal vesicle membranes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 106, 1075-1081.
- Hardwick, K.G. et al. (1990):** *ERD1*, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J* 9, 623-630.
- Hartmann-Petersen, R. Seeger, M. and Gordon, C. (2003):** Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 28, 26-31.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D. and Buchner, J. (2005):** Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 842-846.
- 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.
- Hausman, S.Z. and Burns, D.L. (1992):** Interaction of pertussis toxin with cells and model membranes. *J Biol Chem* 267, 13735-13739.

- 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.
- Haynes, C.M., Titus, E.A. and Cooper, A.A. (2004):** Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell* 15, 767-776.
- 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. *Biochemistry* 36, 11051-11054.
- Heiligenstein, S. et al. (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.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991):** Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J* 10, 555-562.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004):** Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998):** The Ubiquitin system. *Ann Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hicke, L. (1999):** Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 9, 107-112.
- Hicke, L., Yoshihisa, T. and Schekman, R. (1992):** Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 3, 667-676.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H. (1996):** ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.

- Hitchcock, A.L., Krebber, H., Fietze, S., Lin, A., Latterich, M. and Silver, P.A. (2001):** The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell* 12, 3226-3241.
- Horton, R.M. et al. (1989):** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlapping extension. *Gene* 77, 61-68.
- Hosokawa, N. et al. (2001):** A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2, 415-422.
- Huang, D., Friesen, H. and Andrews, B. (2007):** Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* 66, 303-314.
- Hutchins, K. and Bussey, H. (1983):** Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol* 154, 161-169.
- Huyer, G. et al. (2004):** Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* 279, 38369-38378.
- 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.
- Ishida, B., Cawley, D.B., Reue, K. and Wisnieski, B.J. (1983):** Lipid-protein interactions during ricin toxin insertion into membranes. Evidence for A and B chain penetration. *J Biol Chem* 258, 5933-5937.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983):** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.
- Iversen, T.-G., Skretting, G., van Deurs, B. and Sandvig, K. (2003):** Clathrin-coated pits with long, dynamin-wrapped necks upon expression of a clathrin antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5175-5180.
- Jackson, M.E., Simpson, J.C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L.M. and Lord, J.M. (1999):** The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 112, 467-475.

- Jackson, P.K. et al. (2000):** The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 10, 429-439.
- Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J. and Aebi, M. (1998):** Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 142, 1223-1233.
- Jakob, C.A. et al. (2001):** Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2, 423-430.
- Jamieson, D.J. (1998):** Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.
- Jarosch, E. et al. (2002):** Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nature Cell Biol* 4, 134-139.
- Jentsch, S. and Rumpf, S. (2006):** Cdc48 (p97): a ‚molecular gearbox‘ in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci* 32, 6-11.
- Johnson, A.E. and van Waes, M.A. (1999):** The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 799-842.
- Johnson, E.S., Ma, P.C.M., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995):** A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 270, 17442-17456.
- Jolliffe, N.A. et al. (2006):** The N-terminal ricin propeptide influences the fate of ricin A-chain in tobacco protoplasts. *J Biol Chem* 28, 23377-23385.
- Joseph, K.C., Stieber, A. and Gonatas, N.K. (1979):** Endocytosis of cholera toxin in GERL-like structures of murine neuroblastoma cells pretreated with GM1 ganglioside. *J Cell Biol* 81, 543-554.
- Kabani, M. et al. (2003):** Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* 14, 3437-3448.
- Kaiser, C. (2000):** Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3783-3785.
- Karas, M., Bachman, D., Bahr, U. and Hillenkamp, F. (1987):** Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 78, 53-68.

- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1997):** Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol Biol* 8, 1845-1862.
- Kelley, W.L. (1998):** The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* 23, 222-227.
- Kim, I., Mi, K. and Rao, H. (2004):** Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Mol Biol Cell* 15, 3357-3365.
- Kim, W. Spear, E.D. and Ng, D.T. (2005):** Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* 19, 753-764.
- Klassen, R., Teichert, S. and Meinhardt, F. (2004):** Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Mol Microbiol* 53, 263-273.
- Klose, J. (1975):** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 211-243.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K. and Wolf, D.H. (1996):** Der1p, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J* 15, 753-763.
- Koegl, M. et al. (1999):** A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.
- Konarska, M.M., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. (1984):** Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell* 38, 731-739.
- Koopmann et al. (2000):** Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13, 117-127.
- Kostova, Z., Tsai, Y.C. and Weissman, A.M. (2007):** Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Sem Cell Dev Biol* 18, 770-779.
- Kota, J., Gilstring, C.F. and Ljungdahl, P.O. (2007):** Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J Cell Biol* 176, 617-628.

- Kraus, S. (2007):** Funktionsverlust der Ionenpumpe Pmr1 induziert programmierten Zelltod in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*, Universität Stuttgart.
- Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1984):** Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucl Acids Res* 12, 7057-7070.
- Kurihara, T. and Silver, P. (1993):** Suppression of a sec63 mutation identifies a novel component of the yeast endoplasmic reticulum translocation apparatus. *Mol Biol Cell* 4, 919-930.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982):** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Lasaosa, M. (2008):** Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography coupled to MALDI TOF/TOF mass spectrometry: an approach for shotgun proteome analysis. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Lederkremer, G.Z. et al. (2001):** Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10704-10709.
- Lee, R.J. et al. (2004):** Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J* 23, 2206-2215.
- Lencer, W.I. et al. (1995):** Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 131, 951-962.
- Lencer, W.I. and Tsai, B. (2003):** The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci* 28, 639-645.
- Lesage, G., Guimond, J., and Boileau, G. (2003):** Trans-Complementation assay establishes the role of proregion hydrophobic amino acid residues in the biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* Kex2p endoprotease. *Yeast* 20, 397-406.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1990):** A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1992):** Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1992)a:** Sequence of a second human KDEL receptor. *J Mol Biol* 226, 913-916.

- Lewis, M.J., Sweet, D.J. and Pelham, H.R. (1990):** The *ERD2* gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61, 1359-63.
- Lilley, B.N. and Ploegh, H.L. (2004):** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.
- Lipson, C. et al. (2008):** A proteasomal ATPase contributes to dislocation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates. *J Biol Chem* 283, 7166-7175.
- Liu, C. et al. (2002):** Conformational remodelling of proteasomal substrates by PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. *J Biol Chem* 277, 26815-26820.
- London, E. and Luongo, C.L. (1989):** Domain specific bias in arginine/lysine usage by protein toxins. *Biochem Biophys Res Comm* 160, 333-339.
- Lord, J.M. and Roberts, L.M. (1998):** Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol* 2, 733-736.
- Lord, J.M. et al. (2003):** Retrograde transport of toxins across the endoplasmic reticulum membrane. *Biochem Soc Trans* 31, 1260-1262.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, R., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995):** Crystal structure of the 20S proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 angstrom resolution. *Science* 268, 533-539.
- Ludovico, P. et al. (2001):** *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147, 2409-2415.
- Lyman, S.K. and Schekman, R. (1995):** Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 131, 1163-1171.
- Madeo, F., Fröhlich, E. and Fröhlich, K.U. (1997):** A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139, 729-734.
- Madeo, F. et al. (1999):** Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145, 757-767.
- Madeo, F. et al. (2002):** A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.

- 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.H. and Söling, 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.
- Majoul, I. et al. (1998):** KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J Cell Biol* 143, 601-612.
- Marshall, T. and Williams, K. (1991):** Drug interference in the Bradford and 2,2'-bichinonic acid protein assays. *Anal Biochem* 198, 352-354.
- Martinac, B. et al. (1990):** Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6228-6232.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K. and Rapoport, T.A. (1999):** BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.
- 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 (Pt 2), 425-431.
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A. and Wolf, D.H. (2004):** A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO reports* 5, 692-697.
- Mehlgarten, C. and Schaffrath, R. (2003):** Mutant casein kinase I (Hrr25p/Kti14p) abrogates the G1 cell cycle arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin in budding yeast. *Mol Genet Genomics* 269, 188-196.

- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986):** Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55, 663-700.
- Mentges, J.M. (1997):** Untersuchungen zur reversen Sekretion am Beispiel des viralen Killertoxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz.
- Metzger, M.B., Maurer, M.J., Dancy, B.M. and Michaelis, S. (2008):** Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J Biol Chem* 283, 32302-32316.
- Meyer-Siegler, K. et al. (1991):** A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Nat Acad Sci USA* 88, 8460-8464.
- Miseta, A., Kellermayr, R., Aiello, D.P., Fu, L. and Bedwell, D.M. (1999):** The vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* 451, 132-136.
- Molinari, M., Gall,i C., Piccaluga, V., Pieren, M. and Paganetti, P. (2002):** Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J Cell Biol* 158, 247-257.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. and Yura, T. (1996):** Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* 1, 803-817.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M. and Sambrook, J. (1993):** A transmembrane proteine with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74, 743-756.
- Mullins, C., Meyer, H., Hartmann, E., Green, N. and Fang, H. (1996):** Structurally related spc1p and spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct. *J Biol Chem* 271, 29094-20999.
- Mullis, K. et al. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- Mullis, K.B. (1990):** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48, 579-583.

- Munitz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P. and Riezman, H. (2000):** The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148, 925-930.
- Nakano, A. and Muramatsu, M. (1989):** A novel GTP-binding protein Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 109, 2677-2691.
- Nakatsukasa, K., Huyer, G., Michaelis, S. and Brodsky, J.L. (2008):** Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein. *Cell* 132, 101-112.
- Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K. and Endo, T. (2001):** Mnl1p, an  $\alpha$ -mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J Biol Chem* 276, 8635-8638.
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., Sommer, T. (2005):** Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 993-998.
- Ng, D.T.W., Brown, J.D. and Walter, P. (1996):** Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, 269-278.
- Nikawa, J. and Yamashita, S. (1992):** *IRE1* encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 6, 1441-1446.
- Nikko, E. and André, B. (2007):** Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic* 8, 566-581.
- Nishikawa, S., Brodsky, J.L. and Nakatsukasa, K. (2005):** Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem (Tokyo)* 137, 551-555.
- 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.
- Nørgaard, P. et al. (2001):** Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol* 152, 553-562.
- O'Farrell, P.H. (1975):** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Bio Chem* 250, 4007-4021.

- Ohya, Y, Miyamoto, S., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1986):** Calcium-sensitive *cls4* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in bud formation. *J Bacteriol* 165, 28-33.
- Okuda-Shimizu, Y. and Hendershot, L.M. (2007):** Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol Cell* 28, 544-554.
- Orci, L. et al. (1991):** Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8611-8615.
- Ostergaard, H., Henriksen, A., Hansen, F.G. and Winther, J.R. (2001):** Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J* 20, 5853-5862.
- Otte, S. and Barlowe, C. (2002):** The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required *in trans* for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO J* 21, 6095-6104.
- Otte, S. and Barlowe, C. (2004):** Sorting signals can direct receptor-mediated export of soluble proteins into COPII vesicles. *Nat Cell Biol* 6, 1189-1194.
- Otte, S. et al. (2001):** Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between ER and Golgi complex. *J Cell Biol* 15, 503-517.
- Panzner, S. et al. (1995):** Post-translational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81, 561-570.
- 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.
- Parikh, B.A., Tortora, A., Li, X., and Tumer, N.E. (2008):** Ricin inhibits activation of the unfolded protein response by preventing splicing of the *HAC1* mRNA. *J Biol Chem* 283, 6145-6153.
- Park, C.M. et al. (1994):** Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol* 11, 155-164.
- Parlati, F., M. Dominguez, J. J. M. Bergeron, and D. Y. Thomas. (1995):** *Sacharomyces cerevisiae* *CNE1* encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* 270, 214-253.

- Passmore, L.A. and Barford, D. (2004):** Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 379, 513-525.
- Pelham, H.R. (1988):** Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J* 7, 913-918.
- Pelham, H.R. (1989):** Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *EMBO J* 8, 3171-3176.
- Pelham, H.R. (1989)a:** Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 5, 1-23.
- Pelham, H.R. (1990):** The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 15, 483-6.
- 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.
- Perzov, N., Padler-Karavani, V., Nelson, H. and Nelson, N. (2002):** Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis. *J Exp Biol* 205, 1209-1219.
- Peters, J.M. (2006):** The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.
- Pfeiffer, P. and Radler, F. (1984):** Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Arch Microbiol* 137, 357-361.
- Pfund, C. et al. (1998):** The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J* 17, 3981-3989.
- Pickart, C.M. (2001):** Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- Pilon, M., Schekman, R. and Römisch, K. (1997):** Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16, 4540-4548.
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D. and Schekman, R. (1998):** Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 9, 3455-3473.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., und Rapoport, T.A. (1998):** Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94, 795-807.

- Plemper, 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.
- Plemper, 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.
- Polonelli, L., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Morace, G. and Chezzi, C. (1991):** Interfaces of the yeast killer phenomenon. *Crit Rev Microbiol* 18, 47-87.
- Powilleit, F. (2004):** Entwicklung viraler Expressionssysteme und deren Anwendungsmöglichkeiten in Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Pozos, T.C., Sekler, I. and Cyert, M.S. (1996):** The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is required for vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange and is related to mammalian  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchangers. *Mol Cell Biol* 16, 3730-3741.
- 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.
- Radler, F., Herzberger, S., Schönig, I. and Schwarz, P (1993):** Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol* 139, 495-500.
- Radler, F., Schmitt, M.J. and Meyer, B. (1990):** Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch Microbiol* 154, 175-178.
- Ralsler, M. et al. (2007):** Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol* 6, 1-17.
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I, Kalocay, M., Richly, H. and Jentsch, S. (2001):** Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48 (Ufd1/Npl4), an ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677.
- Ravid, T., Kreft, S.G. and Hochstrasser, M. (2006):** Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *EMBO J* 25, 533-543.
- Raykhel, I. et al. (2007):** A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* 179, 1193-1204.

- Read, S. and Northcote, D. (1981):** Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* 116, 53-64.
- Reiter, J. (2004):** Untersuchungen zur Wirkungsweise eines viralen A/B-Toxins der Hefe: Kernlokalisierung, Apoptose und Zellzyklus-Arrest. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- 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.
- Revillion, F., Pawlowski, V., Homez, L. and Peyrat, J.P. (2000):** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 36, 1038-1042.
- Richards, A.A., Stang, E., Pepperkokk, R. and Parton, R.G. (2002):** Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection. *Mol Biol Cell* 13, 1750-1764.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegge, C. and Jentsch, S. (2005):** A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120, 73-84.
- 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.
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M. and Emr, S.D.(1988):** Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* 8, 4936-4948.
- Rodighiero, C., Tsai, B., Rapoport, T.A. and Lencer, W.I. (2002):** Role of ubiquitination in retro-translocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. *EMBO reports* 3, 1222-1227.
- Rodrigo-Brenni, M.C. and Morgan, D.O. (2007):** Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets. *Cell* 130, 127-139.
- Römisch, K. (2005):** Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 435-456.
- Rondinelli, R.H., Epner, D.E. and Tricoli, J.V. (1997):** Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in late pathological stage human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1, 66-72.

- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen., C.N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998):** Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 17, 4909-4919.
- Rudolph, H.K.A. et al. (1989):** The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell* 58, 133-145.
- Saiki, R.K. et al. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989):** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> edn NY)
- Sanchez, J. et al. (1997):** Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 324-327.
- Sanchez, A., Alvarez, A.M., Benito, M. and Fabregat, I. (1997):** Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 26, 935-943.
- Sandvig, K. (2001):** Shiga toxins. *Toxicon* 39, 1629-1635.
- Sandvig, K., Garred, Ø., 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):** Diptheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* 87, 828-832.
- Sandvig, K., Prydz, K., Hansen, S.H. and van Deurs, B. (1991):** Ricin transport in brefeldin A-treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. *J Cell Biol* 115, 971-981.
- 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):** Transport of protein toxins into cells: pathways used by Ricin, cholera toxin and shiga toxin. *FEBS Lett* 529, 49-53.
- Santos, A., Álvarez, M., San Mauro, M., Abrusci, C. and Marquina, D. (2005):** The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J Biol Chem* 280, 41881-41892.

- Sato, K. and Nakano, A. (2007):** Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett* 581, 2076-2082.
- Sawant, A.D., Abdelal, A.T. and Ahearn, D.G. (1989):** Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 48-52.
- Schägger, H. and Jagow, G. (1987):** Tricin-sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schäuble, N. (2008):** Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zur Identifizierung von *in vivo* Interaktionspartnern des viralen K28 Toxins in Hefe. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Schenborn, E.T. and Mierendorf, R.C. (1985):** A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucl Acids Res* 13, 6223-6236.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989):** High efficiency transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-346.
- Schimmöller, F. et al. (1995):** The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J* 14, 1329-1339.
- 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.J. (1995):** Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet* 246, 236-246.
- Schmitt, M.J., Brendel, M., Schwarz, R. and Radler, F. (1989):** Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. *J Gen Microbiol*, 135, 1529-1535.
- 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. *Nature Rev* 4, 1-10.

- 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, 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. and Radler, F. (1987):** Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol* 133, 3347-3354.
- Schmitt, M.J. and Radler, F. (1988):** Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 170, 2192-2196.
- Schmitt, M.J. and Tipper, D.J. (1990):** K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 4807-4815.
- Schmitt, M.J. and Tipper, D.J. (1991):** Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotype. *Mol Microbiol* 5, 2331-2338.
- 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.
- Schmitt, M.J. and Tipper, D.J. (1995):** Sequence of M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology* 213, 341-351.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. and Herzog, V. (2000):** Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148, 1203-1212.
- Schmitz, A., Maintz, M., Kehle, T. and Herzog, V. (1995):** In vivo iodination of misfolded proinsulin reveals co-localized signals for BiP binding and for degradation in the ER. *EMBO J* 14, 1091-1098.
- Sehn, M. (2005):** Phäno- und genotypische Charakterisierung eines aus Wein isolierten Killerstammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Semenza, J., Hardwick, K., Dean, N. and Pelham, H. (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):** Untersuchung zur *in vivo* Toxizität und Immunität der Alpha/beta heterodimeren Virustoxine K1 und K28 durch regulierte Expression einzelner Toxinuntereinheiten. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Sendzig, T. (2006):** Identifizierung essentieller Komponenten des intrazellulären Transports eines viralen A/B-Toxins der Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Sevrieva, I. (2009):** Colocalisation studies of the cellular HDEL-receptor Erd2p in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Shamu, C.E. and Walter, P. (1996):** Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* 15, 3028-3039.
- Shamu, C.E., Flierman, D., Ploegh, H.L., Rapoport, T.A. and Chau, V. (2001):** Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell* 12, 2546-2555.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V. Jr. (1967):** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820.
- Shenton, D. and Grant, C.M. (2003):** Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 374, 513-519.
- Sherman, F. (2002):** Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350, 3-41.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996):** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Sidrauski, C. and Walter, P. (1997):** The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90, 1031-1039.
- Simon, I. et al. (2001):** Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell* 106, 697-708.
- Simons, J.F., Ferro-Novick, M.D., Rose, M.D. and Helenius, A. (1995):** BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during Carboxypeptidase Y folding in yeast. *J Cell Biol* 130, 41-49.

- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Römisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. and Lord, J.M. (1999):** Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett* 459, 80-84.
- Sinha, P., Poland, J., Schnolzer, M., and Rabilloud, T. (2001):** A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after twodimensional electrophoresis. *Proteomics* 1, 835-840.
- Smith, P.K. et al. (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 75-85.
- 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.
- Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997):** Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J* 11, 1227-33.
- Spindler, J. (2004):** Untersuchungen zur endocytotischen Aufnahme und intrazellulären Expression von K28-Toxinderivaten in Hefe- und Säugerzellen, *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- 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.
- Stenbeck, G. et al. (1993):**  $\beta$ '-COP, a novel subunit of coatomer. *EMBO J* 12, 2841-2845.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. and Schekman, R. (1992):** Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 3, 129-142.
- Strayle, J., Pozzan, T., and Rudolph, H. K. (1999):** Steady-state free  $\text{Ca}^{2+}$  in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10  $\mu\text{M}$  and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1. *EMBO J* 18, 4733-4743.
- Sturley, S.L., Elliot, Q., LeVitre, J., Tipper, D.J. and Bostian, K.A. (1986):** Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 killer preprotoxin. *EMBO J* 5, 3381-3389.

- Subramanian, S., Woolford, C.A., Drill, E., Lu, M. and Jones, E.W. (2005):** Pbn1p: An essential endoplasmic reticulum membrane protein required for protein processing in the endoplasmic reticulum of budding yeast. *PNAS* 103, 939-944.
- Summer, M.K., Pan, B., Mukhyala, K. and Jackson, P.K. (2008):** The unique N Terminus of the UbcH10 E2 enzyme controls the threshold for APC activation and enhances checkpoint Regulation of the APC. *Cell* 31, 544-556.
- Suzuki, C.K., Bonifacino, J.S., Lin, A.Y., Davis, M.M. and Klausner, R.D. (1991):** Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. *J Cell Biol* 114, 189-205.
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (1999):** The Doa4 deubiquitination enzyme is required for Ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 2583- 2594.
- Swanson, R., Locher, M. and Hochstrasser, M. (2001):** A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* 15, 2660-2674.
- Tanaka, T., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. and Matsuo, T. (1988):** Protein and polymer analysis up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2, 151-153.
- Tao, J. et al. (1990):** *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol* 10, 1373-1381.
- Taxis, C., Hitt, R., Park, S.H., Deak, P.M., Kostova, Z. and Wolf, D.H. (2003):** Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* 278, 35903-35913.
- Thornton, B.R., and Toczyski, D.P. (2006):** Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* 20, 3069-3078.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000):** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94-102.
- Tipper, D.J. and Bostian, K.A. (1984):** Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol Rev* 48, 125-56.
- Tipper, D.J. and Schmitt, M.J. (1991):** Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol* 5, 2331-2338.

- Tomasi, M. and Montecucco, C. (1981):** Lipid insertion of cholera toxin after binding to GM1-containing liposomes. *J Biol Chem* 256, 11177-11181.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockart, D.J., Weissman, J.S. and Walter, P. (2000):** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- 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.
- Unlü, M., Morgan, M.E. and Minden, J.S. (1997):** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Vashist, S. et al. (2001):** Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol* 155, 355-367.
- Vashist, S. and Ng, D.T.W. (2004):** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 1, 41-52.
- Vembar, S.S. and Brodsky, J.L. (2008):** One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Rev* 9, 944-957.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999):** The 19S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-1068.
- Wahlman, J., DeMartino, G.N., Skach, W.R., Bulleid, N.J., Brodsky, J.L. and Johnson, A.E. (2007):** Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell* 129, 943-955.
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2001):** Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J* 20, 3124-3131.
- Waters, G. and Blobel, G. (1986):** Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur post-translationally and requires ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 102, 1543-1550.
- Waters, M.G., Serafini, T. and Rothman, J.E. (1991):** 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349, 248-251.

- Welihinda, A.A. and Kaufman, R.J. (1996):** The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* 271, 18181-18187.
- Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. (1999):** The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53, 155-187.
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1996):** Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13797-13081.
- 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, 3443-3449.
- West, R.W.J., Yocum, R.R. and Ptashne, M. (1984):** *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UAS<sub>G</sub>. *Mol Cell Biol* 4, 2467-2478.
- White, J. et al. (1999):** Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147, 743-760.
- Wickner, R.B. (1989):** Yeast virology. *FASEB J* 3, 2257-2265.
- Wickner, R.B. (1992):** Double- and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* 46, 347-375.
- Wickner, R.B. (1993):** Host control of yeast dsRNA virus propagation and expression. *Trends Microbiol* 1, 294-299.
- Wickner, R.B. (1996):** Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60, 250-265.
- Wickner, R.B., Bussey, H., Fujimura, T. and Esteban, R. (1995):** Viral RNA and the killer phenomenon of *Saccharomyces*. In: *The Mycota, Genetics and Biotechnology* (Kück Ed), pp.211-226. Springer Verlag, Berlin.
- Wickner, R.B. and Leibowitz, M.J. (1976):** Two chromosomal genes required for killing expression in killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 82, 429-442.
- Wilkinson, B.M. et al. (1997):** Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J* 15, 4549-4559.

- Wilkinson, C.R. et al. (2001):** Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3, 939-943.
- Wilson, D.W., Lewis, M.J. and Pelham, H.R.B. (1993):** pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *J Biol Chem* 268, 7465-7468.
- Wu, T.L. (2006):** Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* 328, 71-95.
- YaDeau, J.T., Klein, C. and Blobel, G. (1991):** Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the Sec11 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 517-521.
- 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.
- Ye, Y., Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. (2001):** The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.
- Yoshida, T. Chen, C.C., Zhang, M.S. and Wu, H.C. (1991):** Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of Ricin, modeccin, and Pseudomonas toxin. *Exp Cell Res* 192, 389-395.
- Youker, R.T., Walsh, P., Beilharz, T., Lithgow, T. and Brodsky, J.L. (2004):** Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol Biol Cell* 15, 4787-4797.
- Young, B.P., Craven, R.A., Reid, P.J., Willer, M. and Stirling, C.J. (2001):** Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum *in vivo*. *EMBO J* 20, 262-271.
- 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, M. and Haslam, D.B. (2005):** Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun* 73, 2524-2532.
- Yu, H., King, R.W., Peters, J.M. and Kirschner, M.W. (1996):** Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr Biol* 6, 455-466.

- Zhang et al. (1995):** The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J Mol Biol* 251, 563-73.
- Zhang, Y. et al. (2001):** Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 1303-1314.
- Zhou, M. and Schekman, R. (1999):** The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* 4, 925-934.
- Zhu, H., Bussey, H., Thomas, D.Y., Gagnon, J. and Bell, A.W. (1987):** Determination of the carboxyl termini of the alpha and beta subunits of yeast killer toxin: requirement of a carboxypeptidase B-like activity for maturation. *J Biol Chem* 262, 10728-10732.
- Zhu, H. and Bussey, H. (1989):** The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol* 55, 2105-2107.
- Zhu, Y.S., Kane, J., Zhang, X.Y., Zhang, M. and Tipper, D.J. (1993):** Role of the gamma component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. *Yeast* 9, 251-266.
- Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999):** AAA ATPases at the crossroads of protein life and death. *Nat Cell Biol* 1, E97-E98.

### Internetquellen

[www.openbiosystems.com](http://www.openbiosystems.com)

[www.expasy.ch/tools/peptidecutter](http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter)

# **TEIL B**

## **K28 und Säugerzellen**

-

## **Untersuchungen zu Aufnahme und Toxizität**

durchgeführt am Institut für Krebsforschung, Oslo  
in der Arbeitsgruppe von  
Prof. Dr. Kirsten Sandvig

## I Einleitung

Das von *Vibrio cholerae* sezernierte Cholera Toxin (CT) ruft nach Eintritt in Darmepithelzellen massive sekretorische Diarrhö hervor (Lencer und Tsai, 2003). Während auch weitere bakterielle A/B-Toxine humane Zellen penetrieren und schwere, z.T. lebensbedrohliche Krankheitsverläufe verursachen, ist die Toxizität des viralen Killertoxins K28 aus *S. cerevisiae* auf den Menschen bislang kaum untersucht. Wie das Cholera Toxin und viele andere A/B-Toxine gehört K28 zu den sogenannten invasiven Toxinen, die den Sekretionsweg der Zielzelle nach endozytotischer Internalisierung retrograd durchlaufen und ihre toxische Wirkung erst im Cytosol entfalten (Eisfeld et al. 2000; Hazes und Read, 1997; Sandvig et al., 1992; Majoul et al., 1996, Wesche et al., 1999; Koopmann et al., 2000, Sandvig und van Deurs, 2002; Lencer und Tsai, 2003). Toxine dieser Gruppe zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Toxizität durch Zerstörung des Golgi-Apparates mittels Brefeldin A verhindert wird (Yoshida, et al., 1991; Sandvig, et al., 1991). Untersuchungen an diversen A/B-Toxinen wie CT oder Shiga Toxin (Stx) führten zu einer recht detaillierten Vorstellung der endozytotischen Aufnahme und des retrograden Transportes solcher Toxine (Joseph et al., 1979; Schmitz et al., 2000; Sandvig, 2001; Sandvig und van Deurs, 2000; 2002). Beispielsweise konnte für CT gezeigt werden, dass nach Bindung des Toxins an das Lipid-Raft-assoziierte Gangliosid GM1 die Toxin-Internalisierung über Endozytose erfolgt. Das Toxin wird anschließend mit Hilfe von GM1 zum Golgi-Apparat transportiert und gelangt von dort über COPI-abhängigen Transport retrograd zum ER (Majoul et al., 1998; Richards et al., 2002). Während Shiga Toxin (Stx) und einige andere A/B-Toxine das ER COPI-unabhängig erreichen, wird dieser Transportweg beim CT zumindest teilweise durch das ER-Retentionssignal KDEL gesteuert, das am C-Terminus der A2-Kette lokalisiert ist (Lencer und Tsai, 2003) und die Effizienz des

ER-Transportes steigert (Lencer *et al.*, 1995). Chaudhary und Mitarbeiter (1990) konnten nachweisen, dass auch das *Pseudomonas* Exotoxin A (ExoA) eine C-terminale KDEL-ähnliche Sequenz besitzt, die im Golgi die Bindung des Toxins an den KDEL-Rezeptor vermittelt und das Toxin auf diese Weise zum ER dirigiert.

Ebenso wird das virale Hefetoxin K28 nach Interaktion mit einem  $\alpha$ -1,3-Mannoprotein auf Ebene der Zellwand und einem energieabhängigen Transfer zur Plasmamembran von der Zielzelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose internalisiert und besitzt ein ähnliches ER-Retentionssignal am C-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses HDEL-Motiv für den Eintritt in die Zielzelle von Bedeutung ist und den retrograden Transport des Toxins zum ER vermittelt (Mentges, 1997; Eisfeld, 2001). Zudem wird angenommen, dass das Tetrapeptid auch für die Bindung an die Plasmamembran erforderlich ist, in der Erd2p kolokalisiert und als Membranrezeptor für K28 fungiert (Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein, 2008; Sevrieva, 2009). Säugerzellen besitzen drei KDEL-Rezeptoren (Lewis und Pelham, 1992a; Raykhel *et al.*, 2007), die große Homologien zum Heferezeptor Erd2p aufweisen (Lewis und Pelham, 1990). Da diese Rezeptoren durch die Bindung von K/HDEL-ähnlichen Motiven nicht nur die ER-Retention ER-luminaler Proteine vermitteln, sondern andererseits von invasiven A/B-Toxinen ausgenutzt werden, um in das ER zu gelangen, wäre es durchaus denkbar, dass K28 ebenfalls von Säugerzellen internalisiert werden kann und mit Hilfe eines dieser KDEL-Rezeptoren in das ER transportiert wird. Das Ziel dieses mehrwöchigen Projektes war daher die Untersuchung der toxischen Wirkung von K28 auf verschiedene Säuger-Zelllinien. Hierbei sollte experimentell analysiert werden, ob K28 auch in höheren Eukaryoten, insbesondere in humanen Zellen, einen Zellzyklusarrest sowie eine Hemmung der DNA-Synthese hervorruft. Zusätzlich sollte durch Immunfluoreszenzmikroskopie der Nachweis erbracht werden, ob K28 in der Lage ist, an die Oberfläche humaner Zellen zu binden und endozytotisch internalisiert zu werden. Im Gegensatz zu Hefeproteinen

trägt die Mehrheit ER-residenter Proteine tierischer Zellen eine KDEL-Sequenz anstelle des HDEL-Motivs (Pelham, 1989) – obwohl Wilson *et al.* (1993) herausfanden, dass KDEL-Rezeptoren höherer Eukaryoten eine höhere Affinität zu HDEL besitzen. Sie spekulierten aufgrund dieser Beobachtung, dass KDEL in diesen Zellen das bevorzugte Sortiersignal ist, weil gerade durch die schwächere Bindung die Freisetzung der Proteine im ER erleichtert wird (Wilson *et al.*, 1993). In erster Linie sollte in diesem Projekt die generelle Fähigkeit von K28 analysiert werden, auf Säugerzellen wachstumshemmend oder gar cytotoxisch zu wirken. Daher sollte ein Toxinderivat eingesetzt werden, das anstelle des Hefe-Retentionssignals das in Säugerzellen eher übliche KDEL-Motiv trägt. Unter der Annahme, dass auf der Ebene der Plasmamembran höherer eukaryotischer Zellen der KDEL-Rezeptor ebenfalls in geringer Kopienzahl vorliegt, sollte diese Modifikation zu einer verbesserten Toxinbindung führen und gleichzeitig den retrograden Transport von K28 in das ER erleichtern.

Während nach Transfektion von COS-Zellen mit verschiedenen K28 $\alpha$ -Derivaten eine um 50 % verringerte Zellproliferation beobachtet werden konnte, waren frühere Versuche zur Analyse der Wirkung von exogen appliziertem K28-Toxin auf humane Zellen bislang nicht erfolgreich, da bereits durch die gewählten Pufferbedingungen ein Großteil der Zellen abgetötet wurde (Spindler, 2004). Insbesondere die Wahl der pH- und Temperaturbedingungen ist kritisch, da K28 bei einem sauren pH-Wert von 4,7 und Temperaturen um 20°C die größte Aktivität besitzt, Säugerzellen jedoch bei 37°C und im neutralem pH-Bereich kultiviert werden und sehr empfindlich auf Schwankungen reagieren. In der vorliegenden Arbeit sollten die Inkubationsbedingungen daher entsprechend modifiziert und die Toxizitäts-Assays an diversen Zelllinien durchgeführt werden.

## II Material und Methoden

### 1. Herstellung eines K28-KDEL-FLAG-(His)<sub>6</sub>-Toxin-konzentrates

Das für die Experimente an Säugerzellen eingesetzte K28-Toxin mit KDEL-Motiv und FLAG-(His)<sub>6</sub>-„Tag“ wurde in *Kluyveromyces lactis* exprimiert. Im Folgenden sind die Konstruktion der Toxinvariante sowie die Herstellung des Toxin-konzentrates beschrieben.

#### 1.1 Primer

**Tabelle 17: Primer zur Herstellung des Toxin-konstruktes K28protox-KDEL-FLAG-(His)<sub>6</sub>.** Die Sequenzangabe erfolgt jeweils in 5'-3'-Orientierung. Start- und Stopp-Kodons sind fettgedruckt dargestellt, Schnittstellen sind hellgrau hinterlegt und His- sowie FLAG-„Tag“-Sequenzen dunkelgrau. Der spätere Aminosäureaustausch von His nach Lys ist kursiv dargestellt.

Primer	Sequenz
3'K28FLAG/His-KDEL_Bgl_Not	GCGGCCGC AGATCT <b>TTA</b> <b>GTG GTG GTG GTG GTG</b> <b>GTG</b> CTT ATC ATC ATC ATC CTT <b>GTA ATC</b> GCG TAG CTC ATC <i>CTT</i> GCA CCT TG
5'K28 ohne pre	CTC GAG GAA TTC <b>ATG</b> CCGAC ATCTGAGGACAGCAGGG

#### 1.2 PCR-Amplifizierung

Die Herstellung des Toxin-konstruktes K28ptox-KDEL-FLAG-(His)<sub>6</sub> erfolgte mittels PCR mit den beiden in Tabelle 17 aufgeführten sequenzspezifischen Primern, wobei das entsprechende Konstrukt mit HDEL-Motiv aus der Diplomarbeit von Laura Guida als Template diente. Die Amplifizierung erfolgte mit dem Standard-PCR-Programm

(siehe Punkt 3.8, Material und Methoden Teil A), wobei eine Annealing-Temperatur von 52°C gewählt wurde. Die PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung in den Vektor pYES2.1 zwischenkloniert.

### 1.3 *K. lactis*-Transformation

#### YCB-Agar mit 5 mM Acetamid (nach NEB)

YCB-Medium-Pulver	5,85 g
Bacto-Agar	10,0 g
Na-Phosphat, 1 M Stammlösung	15 ml
Aqua dest.	ad 495 ml

Eine 100-fache Acetamid-Stammlösung wurde sterilfiltriert.

Na-Phosphat-Puffer-Stammlösung und YCB-Medium wurden getrennt vom Agar autoklaviert.

#### 1 M Na-Phosphat-Stammlösung

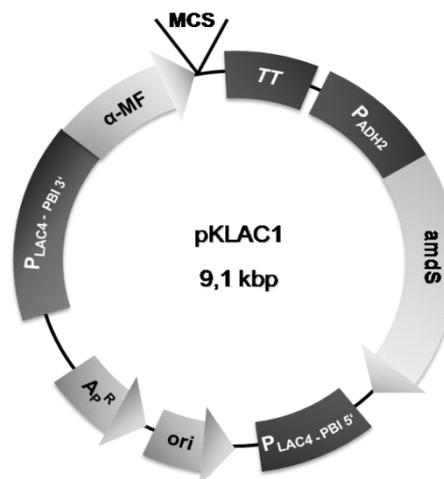
Lösung A: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 M
Lösung B: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 M

Zur Transformation von *K. lactis* kam das *K. lactis* Protein Expression Kit (New England Biolabs) zum Einsatz. Zunächst wurde das Insert eines korrekt sequenzierten Klons nach *BglII/NotI*-Verdau in den integrativen *K. lactis*-Expressionsvektor pKLAC1 unmittelbar hinter die Sequenz der nativen *K. lactis*  $\alpha$ -mating factor (MF) Sekretionsdomäne kloniert, welche ein Sekretionssignal sowie eine pro-Domäne enthält, die durch Prozessierung im Sekretionsweg entfernt werden. Diese Sequenz erlaubt die spätere Sekretion von K28. Nach erfolgreicher Ligation wurden 5  $\mu$ g reiner Plasmid-DNA zur Linearisierung des Vektors mit *KsnI* restringiert. Die Transformation richtete sich nach den Angaben des Herstellers. 50  $\mu$ l kompetente Zellen wurden mit 155  $\mu$ l NEB-Trafo-Lösung versetzt und mit 3,75  $\mu$ l der linearisierten Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30°C und 1 h bei 37°C wurden die Zellen pelletiert, mit sterilem Wasser gewaschen und

in 1 ml YEPD-Medium resuspendiert. Nach 45-minütiger Inkubation wurden die Zellen erneut mit Wasser gewaschen und 100 µl zur Selektion plasmidhaltiger Klone auf einer Acetamid-haltigen YCB-Platte ausplattiert.

#### 1.4 Herstellung des Toxinkonzentrates

Der Vektor pKLAC integriert in die Promotor-Region des *LAC4* Locus im *K. lactis* Genom, der je nach Stamm-Hintergrund eine bis zu 100-fach gesteigerte Expression bei Wachstum auf Galaktose-haltigem Medium ermöglicht. Daher wurde die transformierte Hefe in B-Medium angezogen, das mit 2% Galaktose supplementiert war. Sowohl die Anzucht als auch die anschließende Herstellung des Toxinkonzentrates erfolgten analog zur K28-Produktion in *S. cerevisiae* MS300b (siehe Punkt 5.6, Material und Methoden (Teil 1)).



**Abbildung 56: Schematische Darstellung des verwendeten Integrationsvektors pKLAC1.** Ein korrekt sequenziertes Insert wurde mittels *BglII/NotI*-Verdau in den integrativen *K. lactis*-Expressionsvektor pKLAC1 unmittelbar hinter die Sequenz der nativen *K. lactis* α-mating factor (MF) Sekretionsdomäne kloniert. Durch anschließende Linearisierung des Vektors mit *Ksni* wird die Integration in den Promotorbereich des *LAC4* Locus ermöglicht. pKLAC1 enthält die kodierende Sequenz für das Acetamid-spaltende Enzym Acetamidase, das die Selektion auf Acetamid-haltigem YCB-Agar erlaubt.

### 1.5 Affinitätschromatografische Reinigung des His-getagkten K28-Toxins

#### Bindepuffer/Äquilibrationpuffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
NaCl, pH 7,4	500 mM

#### Elutionspuffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
NaCl, pH 7,4	500 mM
Imidazol	500 mM

Vor der weiteren Aufreinigung des His-getagkten K28-Toxinkonzentrates wurde dieses zunächst ü.N. gegen 4 L Bindepuffer dialysiert (Dialyseschläuche mit Porengröße 12-14 kDa; Spectrum Medical Industries). Die affinitätschromatografische Reinigung des dialysierten Konzentrates erfolgte mit Hilfe einer His Trap-Säule (GE Healthcare) und einer Pumpe der Firma Biorad. Hierbei wurden 40 ml Dialysat in zwei Läufen zu je 20 ml unter den in Tabelle 18 dargestellten Bedingungen über die Säule gegeben. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe Material und Methoden Teil A, Punkt 4.2) und anschließender Silberfärbung analysiert.

**Tabelle 18: Affinitätschromatografische Reinigung von heterolog in *K. lactis* exprimiertem His-getagktem K28-Toxinkonzentrat über eine His-Trap-Säule nach vorheriger Ultrafiltration.**

Schritt	Puffer	Puffervolumen	Flussrate
Äquilibration	Bindepuffer	5 ml	1 ml/min
Waschen	Äquilibrationpuffer	10 ml	1 ml/min
Probenaufgabe		2x 20 ml	0,5 ml/min
Elution	Elutionspuffer	8 ml	1 ml/min

## 2. Silberfärbung von SDS-Gelen

### Fixierer

Methanol	50 % (v/v)
Eisessig	5 % (v/v)
Aqua dest.	ad 500 ml

### Natriumthiosulfatlösung zur Sensibilisierung

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,02 %
---	--------

Es wurde zunächst eine 2 %-ige Stammlösung hergestellt und diese anschließend 1:10 verdünnt.

### Färbelösung: Silbernitrat

AgNO <sub>3</sub>	0,1 %
-------------------	-------

Die Lösung wurde bei 4°C abgedunkelt gelagert.

### Entwickler

Formalin	0,04 %
Na-Carbonat	2 %

### Reaktionsstopp:

Tris	4 % (w/v)
Eisessig	2 % (v/v)

Die Silberfärbung stellt eine hochsensitive Methode dar, um Proteine in SDS-Gelen sichtbar zu machen. Im Vergleich zum immunologischen Nachweis im Western-Blot, bei dem eine Nachweisgrenze von 10-100 ng pro Proteinbande erreicht wird, liegt die Sensitivität bei der Silberfärbung bei 1-10 ng. In dieser Arbeit wurde ein nach Shevchenko *et al.* (1996) und Sinha *et al.* (2001) modifiziertes Protokoll verwendet. Zunächst wurde das SDS-Gel 20 min in Fixierlösung äquilibriert. Nach einem 10-minütigen Waschschrift mit 50 % Methanol erfolgte die Sensibilisierung mit 0,02 % Natriumthiosulfatlösung für eine Minute. Unter Schütteln wurde das Gel zweimal eine Minute mit Wasser

gespült. Die Färbung erfolgte mit 0,1 %-iger Silbernitratlösung 20 Minuten bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln. Nach zwei kurzen Waschschritten mit Wasser erfolgte die Entwicklung unter kräftigem Schütteln. Sobald sich die Entwicklerlösung gelb verfärbte, wurde sie erneuert. Waren die gewünschten Banden sichtbar, wurde die Reaktion durch Zugabe von Reaktionsstopp über 30 min abgestoppt.

### 3. Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

Die in der vorliegenden Arbeit für die Toxizitäts-Assays und Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Säugerzelllinien sowie die entsprechenden Kulturbedingungen sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die Medien sind kommerziell erhältlich.

**Tabelle 19: Auflistung der für Toxizitäts-Assays bzw. Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzten Säugerzelllinien und deren Kulturbedingungen**

Zelllinie	Zelltyp	Bemerkungen	Kulturmedium
<b>HeLa</b>	Epithelzellen, humanes Zervixkarzinom		D-MEM + 10% FBS
<b>Hep-2</b>	Epithelzellen, humanes Larynxkarzinom		D-MEM + 10% FBS
<b>NIH-3T3</b>	Fibroblasten, Mausembryo		Quantum 333 + 2 µg/ml Tetrazyklin + 2% BS
<b>BHKasc*</b>	Fibroblasten, Babyhamster-Niere	mit "Clathrin-heavy chain" (CHC) "antisense" RNA (Induktion: ohne Tet)	D-MEM + 10% FBS + 0,5 µg/ml Puromycin + 0,2 mg/ml Tetrazyklin
<b>HeLa Rab5</b>	siehe HeLa	mit Rab5 "antisense" RNA	D-MEM + 10 % FBS + 0,1 mg/ml Hygramycin
<b>BJ</b>	Fibroblasten, normaler humaner Vorhaut		Quantum 333

\* Referenz: Iversen *et al.*, 2003

Die Zellen wurden in den entsprechenden, aus Tabelle 18 zu entnehmenden Medien angezogen, wobei allen Medien 1% Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Zellen wurden jeweils in 24-well Platten angezogen. Abhängig von der Art des Experimentes variierte die Zellzahl pro Well. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen in Wells angezogen, die runde Deckgläser enthielten, auf denen die Zellen adhären konnten. Vor jedem Experiment wurden Wachstumsdichte und Aussehen aller Zellen mikroskopisch überprüft, um eventuelle Kontaminationen auszuschließen.

#### **4. Messung der Proteinbiosynthese**

KOH-Lösung:

KOH                      0,1 M

TCA:                      5 %

Da die K28-Aufnahme pH-abhängig ist und eine optimale Aufnahme bei einem pH-Wert des Kulturmediums von 5,8 erfolgt (Spindler, 2004), sollte zunächst in einem Vorversuch getestet werden, wie lange HeLa-Zellen solch niedrige pH-Bedingungen tolerieren. Dazu wurden ü.N. angezogene HeLa-Zellen ( $4 \times 10^4$  Zellen/Well) einmal in Leucin-freiem Medium mit pH 5,8 und pH 7,4 als Kontrolle gewaschen und anschließend über verschiedene Zeiträume (20, 40, 60 und 120 Minuten) bei 20°C mit dem entsprechenden Medium inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und Veränderungen in Aussehen und Zellzahl protokolliert. Die Überlebensrate der Zellen wurde über eine Messung der Proteinbiosynthese bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 200 µl Leucin-freiem Medium (pH 7,4) aufgenommen, welchem 4 µl/ml [<sup>3</sup>H]-markiertes Leucin (Leucin L(3, 4, 5)-<sup>3</sup>H(N), 3 mCi, Perkin Elmer) zugegeben wurde. Nach 20-minütiger Inkubation bei 20°C wurden die Zellen zweimal mit

800 µl 5 % TCA gewaschen, um zelluläre Proteine zu präzipitieren und freies Leucin zu entfernen. Während 10-minütiger Inkubation mit 200 µl 0,1 M KOH-Lösung wurden die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 3 ml Szintillationsfluid (Perkin Elmer) erfolgte die Messung der Lichtemission („Counts“) als Maß für Protein-gebundenes Leucin mittels Packard TRI-CARB 2100 TR Liquid Scintillation Analyzer.

## 5. Toxizitäts-Assay: DNA-Synthese Messung

K28 induziert in sensitiven Hefen einen Zellzyklus-Arrest in der frühen S-Phase, was zu einer Hemmung der DNA-Synthese führt (Schmitt *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2005). Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen diente daher eine DNA-Synthese-Messung Toxin-behandelter Säugerzellen als Toxizitäts-Assay, um eine mögliche Wirkung von K28 auf höhere Eukaryoten nachzuweisen. Für die Säuger-Experimente wurde eine heterolog in *K. lactis* exprimierte, aktive Toxinvariante eingesetzt, die ein KDEL-Motiv trägt.

Die Messung der DNA-Neusynthese erfolgte nach Toxin-Behandlung der Zellen in 24-Well Platten (4 x 10<sup>4</sup>/Well), wobei zunächst geeignete Inkubationsbedingungen, wie die Menge des Toxinkonzentrates, Inkubationszeit, pH-Bedingungen und Inkubationstemperatur, an HeLa-Zellen getestet wurden. Als Negativkontrollen wurden die Zellen einerseits mit normalem Medium des entsprechenden pH-Wertes inkubiert. In einer weiteren Kontrolle wurde Toxin-freier *K. lactis*-Kulturüberstand eingesetzt, der nach dem Protokoll zur Herstellung des Toxinkonzentrates hergestellt wurde, wobei eine mit dem Leervektor transformierte Hefe verwendet wurde. Die Menge des Toxin-freien Überstandes und des Kontrollmediums entsprach hierbei immer dem eingesetzten Toxinvolumen. Alle Ansätze wurden in mindestens zwei Parallelen pipettiert. Nach der Toxinbehandlung wurde den Zellen frisches, Toxin-freies Bicarbonat-Medium (DMEM) zur Verfügung gestellt und die Zellen 24 Stunden inkubiert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass das Toxin seine Toxizität im Zellkern

entfalten kann. Danach wurde den Zellen über einen Zeitraum von zwei Stunden 1  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (Methyl( $^3\text{H}$ )Thymidin, Amersham) in 500  $\mu\text{l}$  Medium zum Einbau in neusynthetisierte DNA zur Verfügung gestellt. Überschüssiges Thymidin wurde durch zweimaliges Waschen mit 5 % TCA für je fünf Minuten aus dem Ansatz entfernt und DNA-gebundene „Counts“ durch anschließende Behandlung mit 0,1 M KOH (10 min, 20°C) aus den lysierten Zellen freigesetzt. Die Ansätze wurden in Plastik-„Vials“ überführt, mit 3 ml Szintillationsfluid aufgefüllt und die „Counts“ nach Vortexen in einem Packard TRI-CARB 2100 TR Liquid Scintillation Analyzer gemessen. In Tabelle 20 sind alle getesteten Versuchsbedingungen zusammengefasst.

**Tabelle 20: Überblick der getesteten Versuchsbedingungen für den Toxizitätsassay.** Die optimalen Bedingungen sind unterstrichen.

Waschen der Zellen	in Hepes-gepuffertem Medium, pH 7,4
eingesetzte Toxinmenge	variiert von 30 bis 500 $\mu\text{g}$ in Hepes-gepuffertem Medium optimale Konzentration: <u>250 <math>\mu\text{g}</math></u> Toxin
pH-Wert des Mediums (Hepes)	4,8 bis <u>7,4</u>
Inkubationszeit	20 min
Temperatur während Toxin-Behandlung	20 bis 25°C
Inkubation nach Toxin-Behandlung	24 h bei 30°C in Hepes-Medium (pH 7,4) 24 h bei <u>37°C</u> in <u>DMEM</u> , <u>CO<sub>2</sub></u> -Inkubator

## 6. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Hepes-Medium: DMEM mit 25 mM Hepes

10 x PBS-Puffer:

NaCl 1,5 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M

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

Blockinglösung: PBS-Puffer mit 10 % FBS

Zur Untersuchung der Toxinaufnahme durch Säugerzellen wurden HeLa oder Hep-2-Zellen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well ü.N. in 4-Well Platten in DMEM Medium angezogen. Für die Färbung und anschließende Mikroskopie war es notwendig, ein rundes Deckglas in jedes Well zu geben, auf dem die Zellen adhäreren konnten. Die Inkubationsbedingungen wurden analog zum Toxizitäts-Assay gewählt. Demnach wurden die Zellen zunächst in Hepes-gepuffertem Medium mit pH 7,4 gewaschen und anschließend mit 250 µg Toxin in Hepes-Medium mit pH 7,4 (Gesamtvolumen: 200 µl) 20 min bei 20°C inkubiert. Da die Säugerzellen während dieses Experimentes einige Zeit außerhalb des CO<sub>2</sub>-Inkubators behandelt wurden, wurde Hepes-gepuffertes DMEM-Medium (25 mM) eingesetzt. Hepes besitzt aufgrund seiner Säurekonstante (pKs) von 7,55 eine gute Pufferkapazität in einem pH-Bereich von 6,8 bis 8,2. Nach der Toxinbehandlung erfolgten zwei Waschschrte mit PBS, um ungebundenes Toxin zu entfernen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von 300 µl Formalin (Sigma-Aldrich) 20 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator fixiert, um die Zellen in einem möglichst guten Zustand zu erhalten. Die fixierten Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann 4 min mit 0,1 % TritonX-100/PBS permeabilisiert, um die Antikörper-Aufnahme zu gewährleisten. Nach wiederholten Waschschrten erfolgte die Blocking-Reaktion über einen Zeitraum von

einer Stunde. Dazu wurden 15 µl Blockinglösung (10 % FBS/PBS) in eine mit PBS angefeuchtete Dose auf Parafilm pipettiert und das Deckglas vorsichtig mit den Zellen nach unten auf die Lösung gelegt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte analog mit 15 µl Antikörperlösung (verdünnt mit Blockinglösung). Die Inkubation erfolgte mindestens eine Stunde. Nach mehreren Waschschritten in PBS und Blockinglösung wurden die Zellen mit einem sekundären, fluoreszenzgelabelten Antikörper 45 min abgedunkelt inkubiert. Parallel wurde der Antikörperlösung Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin (Molecular probes) in einer Konzentration von 1:200 zugesetzt. Dieses Phalloidin aus dem Knollenblätterpilz bindet spezifisch polymerisierte Aktinfilamente und inhibiert die Disassemblierung der Filamente (Cooper, J.A., 1987) und erlaubt durch Sichtbarmachen des Aktinzytoskeletts die Erkennung von Anomalitäten der Zellmorphologie. Nach weiteren Waschschritten wurde der Nukleus mittels DRAQ5<sup>TM</sup> (Alexis Biochemicals) 6 min bei 37°C angefärbt. Die Deckgläser wurden nun kurz in Aqua dest. getaucht und mit einem kleinen Tropfen „ProLong Gold“ („antifade reaction“) versehen auf einen Objektträger überführt und über Nacht bei 37°C gelagert. Die gefärbten Zellen wurden am nächsten Tag mit Hilfe des konfokalen „Laserscanning“ Mikroskops LSM 700 (Zeiss) mikroskopiert.

## **7. Mikroinjektions-Experimente**

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Experimenten wurde das K28-Toxin direkt in das Cytoplasma von HeLa- und Hep-2-Zellen injiziert, da aus den Ergebnissen der vorherigen Untersuchungen keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob das Toxin tatsächlich von Säugerzellen aufgenommen wird. Diese Mikroinjektions-Experimente wurden freundlicherweise von Dr. Sascha Pust durchgeführt. Die Injektion erfolgte mit Hilfe steriler „Femotips“ (Eppendorf) bei 40-facher Vergrößerung. Um die erfolgreich mit Toxin injizierten Zellen sichtbar zu machen, wurde dem Toxinkonzentrat sowie den

Kontrolllösungen TexasRed-markiertes Dextran zugesetzt. Die Zellen wurden etwa jede Stunde mikroskopisch auf Veränderungen der Zellmorphologie untersucht oder mit Hilfe einer „BioStation<sup>IM</sup>“ (Nikon) über einen Zeitraum von mindestens drei Stunden gefilmt. Die BioStation verbindet ein Mikroskop mit einem Inkubator in einem System und hat so den Vorteil, dass sie „Live Cell“-Aufnahmen über einen längeren Zeitraum ermöglicht, da Temperatur, Feuchtigkeit und CO<sub>2</sub>-Konzentration konstant gehalten werden.

## 8. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Die zur indirekten Immunfluoreszenz oder Fluoreszenzfärbung toxinbehandelter Zellen eingesetzten Antikörper und Farbstoffe sind in Tabelle 21 aufgelistet.

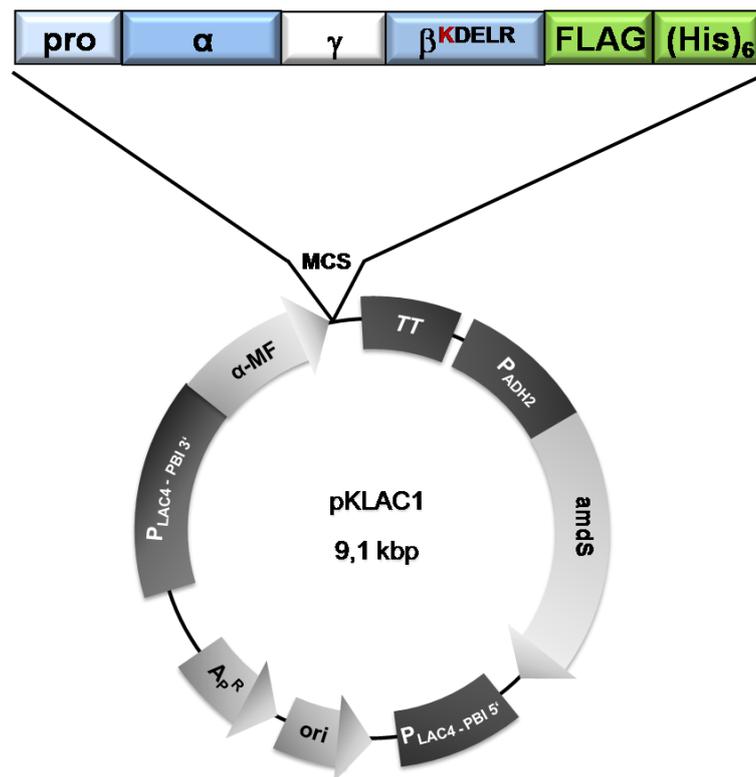
**Tabelle 21: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe zur Fluoreszenzmikroskopie**

Antikörper	Hersteller	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>			
anti-FLAG	Sigma		1:500
anti-K28			1:100
anti-K28- $\alpha$			1:100
anti-K28- $\beta$			1:100
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
anti-Mouse	Jackson	Cy3-gelabelt	1:500
anti-Mouse	Jackson	Cy2-gelabelt	1:500
anti-Rabbit	Jackson	Cy2-gelabelt	1:200
<b>Fluoreszenzfarbstoffe</b>			
Phalloidin	Molecular probes	Rhodamine	1: 200
DRAQ5 <sup>TM</sup>	Alexis Biochemicals		1:1000

### III Ergebnisse

#### 1. Herstellung eines K28-Toxinkonzentrates in *K.lactis*

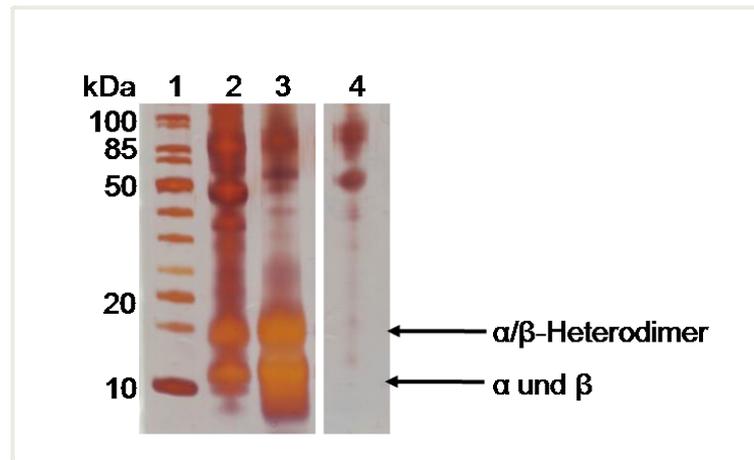
In diesem separaten Projekt sollte die Wirkung des viralen Hefetoxins K28 auf Säugerzellen untersucht werden. Bislang war nicht bekannt, ob K28 von höheren eukaryotischen Zellen internalisiert werden kann. Die endozytotische Aufnahme von nativem Toxin wird durch die  $\beta$ -Untereinheit vermittelt, die am C-Terminus das Aminosäuremotiv HDEL trägt. Zum jetzigen Zeitpunkt deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass dieses Motiv die Bindung von K28 an die Zielzelle vermittelt, indem es auf der Ebene der Plasmamembran mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p wechselwirkt und nach Rezeptorubiquitinierung durch Ubc4p/Rsp5p endozytotisch internalisiert wird (Spindler, 2004; Heiligenstein, 2008; Einfeld, 2001, Sevrieva, 2009). Das ER-Retentionssignal des Säugers ähnelt dem der Hefe, jedoch befindet sich anstelle des Histidinrestes gewöhnlich ein Lysin (Pelham, 1990). In erster Linie ging es darum, mögliche toxische Effekte von K28 auf Säugerzellen nachzuweisen. Um die Aufnahme in die Zielzellen zu erleichtern, wurde für die Säuger-Experimente eine aktive Toxinvariante in *K. lactis* exprimiert, die ein KDEL-Motiv am  $\beta$ -C-Terminus trägt. Ein solches Sortiersignal tragen auch verschiedene andere A/B-Toxine, die Säugerzellen als Wirt nutzen, beispielsweise enthält das Cholera Toxin ein KDEL-Motiv am C-Terminus der A2-Kette (Lencer *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 2004; Majoul *et al.*, 1998). In Abbildung 57 ist dieses Toxinderivat schematisch dargestellt. Die Herstellung erfolgte durch einen Aminosäureaustausch im HDEL-Motiv ausgehend von dem bereits vorhandenen Konstrukt K28protox-HDELR-FLAG-(His)<sub>6</sub>, das während der Diplomarbeit von Laura Guida (2007) entstand. Guida konnte dieses K28-Derivat in aktiver Form erfolgreich und mit hoher Ausbeute in *K. lactis* exprimieren. Die genaue Vorgehensweise zur Herstellung und Klonierung ist dem Material und Methoden-Teil zu entnehmen.



**Abbildung 57: Schematische Darstellung des konstruierten K28-Derivates zur Untersuchung der Wirkung von K28 auf Säugerzellen.** Das Konstrukt K28protox-KDEL-FLAG-(His)<sub>6</sub> besteht aus dem K28-Protoxin, wobei das  $\beta$ -C-terminale HDEL-Motiv durch Aminosäuresubstitution in das Säuger-Retentionssignal KDEL umgewandelt wurde. Hinter dieses Motiv wurden ein FLAG- und ein His-„Tag“ fusioniert, um die spätere affinitätschromatografische Reinigung zu ermöglichen. Das Konstrukt wurde zunächst mit sequenzspezifischen Primern (Details siehe Material und Methoden, Tabelle 17) mittels PCR amplifiziert und anschließend zur Sequenzierung in den TOPO-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen) zwischenkliert. Um das Toxinderivat zur Sekretion zu bringen, wurde das korrekt sequenzierte Konstrukt über *Bgl*II/*Not*I in den integrativen *K. lactis* Expressionsvektor pKLAC1 „in frame“ hinter das Sekretionssignal des *K. lactis*-eigenen  $\alpha$ -„mating“ Faktors kloniert.

Das von *K. lactis* in den Kulturüberstand sezernierte Toxin wurde zunächst mit Hilfe einer Amicon-Ultrafiltrationszelle über einen Filter aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa 200-fach eingengt und sterilfiltriert. Um weitere von dieser Hefe sezernierte Proteine zu entfernen, wurde anschließend eine affinitätschromatografische Reinigung über eine His-Trap-Säule durchgeführt (vgl. Material und Methoden, Punkt 1.5). Nach Dialyse

gegen Bindepuffer wurden insgesamt 40 ml Toxinkonzentrat in zwei Läufen über die Säule gegeben. Die Qualität des unbehandelten und gereinigten Konzentrates wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Als Negativkontrolle diente entsprechend behandelter *K. lactis* Kulturüberstand einer Hefe, die mit dem pKLAC1-Leervektor transformiert wurde.



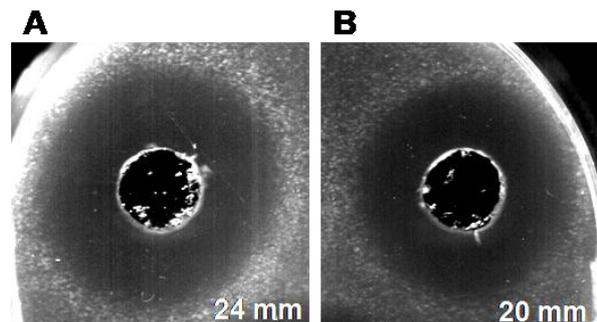
**Abbildung 58: SDS-PAGE und Silberfärbung eines 200-fach eingeeengten und aufgereinigten Kulturüberstandes nach Expression von MFptox-KDELRL-Flag-(His)<sub>6</sub> in *K. lactis*.** Das K28-Konstrukt ptox-KDELRL-Flag-(His)<sub>6</sub> wurde in den Integrationsvektor pKLAC1 hinter das Sekretionssignal des „mating“-Faktors (MF) kloniert. Nach Integration in die Promotorregion des *LAC4*-Locus im Genom von *K. lactis* erfolgte die Anzucht der transformierten Hefe über vier Tage in B-Medium mit 2% Galaktose bei 20°C. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der zellfreie Kulturüberstand unter Benutzung einer Amicon-Ultrafiltrationszelle über einen 10 kDa Filter aus regenerierter Zellulose (Fa. Millipore) eingeeengt, sterilfiltriert und schließlich affinitätschromatografisch über eine His Trap-Säule gereinigt. Die Qualität des Toxinkonzentrates nach Ultrafiltration sowie des Eluates nach der Aufreinigung wurde im SDS-Gel nach Silberfärbung überprüft. Entsprechend konzentrierter *K. lactis* Überstand einer Transformante, die den Leervektor pKLAC1 enthält, diente als Negativkontrolle.

#### Auftragschema:

- Spur 1: Proteingrößenstandard PageRuler unstained, Fermentas
- Spur 2: Toxinkonzentrat nach Einengung über Ultrafiltration (Amicon)
- Spur 3: Toxinkonzentrat nach affinitätschromatografischer Reinigung
- Spur 4: eingeeengter *K. lactis*-Überstand einer mit dem Leervektor pKLAC1 transformierten Hefe

Wie in Abbildung 58 zu erkennen ist, war das Toxinkonzentrat nach Einengung noch stark verunreinigt durch hochmolekulare Proteine. Nach Reinigung über die His-Trap-Säule konnte der Anteil dieser störenden Proteine stark verringert werden. Aus technischen Gründen

gelang es jedoch nicht, vollständig reines K28-Toxin zu erhalten. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese höhermolekularen Proteine möglicherweise toxisch auf Säugerzellen wirken, wurde als Negativkontrolle der Überstand einer *K. lactis*-Kultur, die zwar den Vektor pKLAC1, nicht aber die K28-Sequenz enthielt, auf dieselbe Weise behandelt. Auch bei diesem Konzentrat sieht man deutlich Banden im hochmolekularen Bereich, aber wie erwartet fehlen die Toxin-spezifischen Banden. Somit ist dieses Konzentrat als Negativkontrolle für die späteren Experimente geeignet. Parallel wurde die Aktivität der verschiedenen Toxinkonzentrate im Agardiffusionstest gegen die K28-sensitive Hefe 192.2d bestimmt. Hierbei zeigte das ultrafiltrierte, ungereinigte Konzentrat eine größere Toxizität und erzeugte einen Hemmhof mit 24 mm Durchmesser. Im Vergleich dazu war die Aktivität des affinitätsgereinigten Toxins etwas schwächer, mit 20 mm Hemmhof allerdings durchaus noch akzeptabel (Abbildung 59).



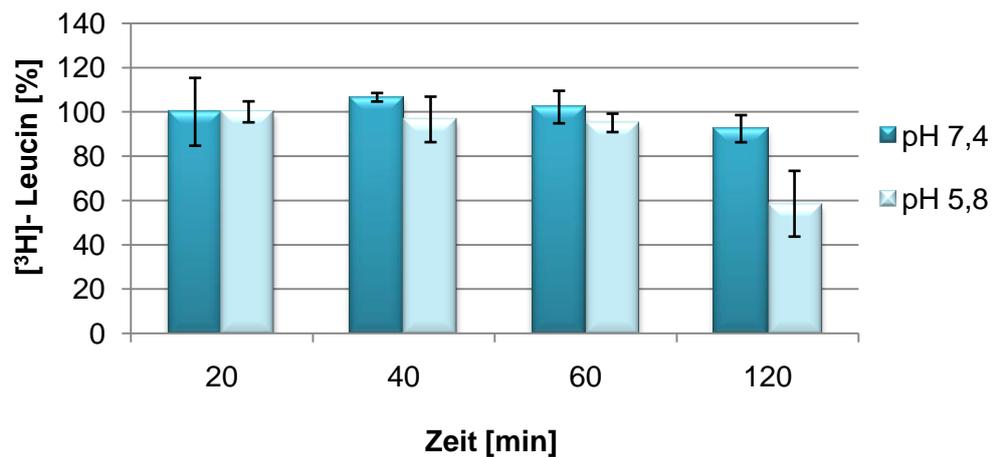
**Abbildung 59: Agardiffusionstest zum Aktivitätsnachweis des hergestellten Konzentrates der Toxinvariante K28<sup>KDEL</sup>-FLAG-(His)<sub>6</sub> nach Produktion in *K. lactis*.** *K. lactis* wurde mit pKlac-K28ptox-KDEL-FLAG-(His)<sub>6</sub> transformiert und die Toxinsekretion in Medium mit 2% Galaktose vier Tage bei 20°C induziert. Die Herstellung des K28-Toxinkonzentrates erfolgte mittels Ultrafiltration über eine 10 kDa Membran einer Ultrafiltrationszelle der Firma Amicon. Das His-getaggte K28-Konzentrat wurde mit Hilfe einer His-Trap-Säule affinitätschromatografisch gereinigt. Für die Analyse der Aktivität beider Konzentrate wurde die K28-sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d (10<sup>6</sup> Zellen) in 15 ml Minimal-Glukose-MBA (pH 4,7) eingebettet und gegen die Toxinkonzentrate getestet. **(A)** zeigt das unbehandelte Konzentrat nach Ultrafiltration und **(B)** das Konzentrat nach affinitätschromatografischer Reinigung. Der Durchmesser der zellfreien Hemmhöfe wurde nach dreitägiger Inkubation bei 20°C als Maß für die Killeraktivität gemessen und ist in der Abbildung rechts unten dargestellt.

## 2. Bestimmung geeigneter Versuchsbedingungen

### 2.1 Einfluss von pH und Temperatur auf HeLa-Zellen

Da Säugerzellen in Kultur sehr sensitiv gegenüber Veränderungen von pH und Temperatur reagieren, sollte in einem Vorversuch analysiert werden, wie lange HeLa-Zellen eine Temperatur von 20°C und einen sauren pH-Wert von 5,8 tolerieren. Diese Bedingungen sind für die Inkubation mit K28-Toxin notwendig, da dieses Toxin bei 20°C die größte Aktivität zeigt und oberhalb dieser Temperatur relativ instabil ist. Nach Inkubation von Agardiffusionstests bei 30°C bilden sich kleinere Hemmhöfe (Spindler, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von K28 an die Oberfläche der Zielzelle pH-abhängig ist. Während die Aktivität bei pH 5,5 noch vollständig gegeben ist, wird das Toxin bei pH-Werten von  $\geq 6$  vollständig inaktiviert (Sehn, 2005). Spindler konnte zeigen, dass K28 bei pH 5,8 noch Restaktivität besitzt – dieser pH-Wert wird demnach von K28 gerade noch toleriert. Die pH-Sensibilität manifestiert sich auf Ebene der Plasmamembran, da selbst Sphäroplasten bei neutralem pH toxinresistent sind. Internalisierungsstudien zeigten zudem, dass bei pH 7,0 deutlich weniger Toxin von den Zellen aufgenommen wird, und dass K28 unter diesen Bedingungen zum größten Teil in die Vakuole gelangt (Spindler, 2004). Weiterhin ergaben durchflusszytometrische Untersuchungen von Spindler, dass ein Großteil von HCT-116 Zellen durch die Pufferbedingungen (pH 4,7) abgetötet wurde, ein pH von 5,8 jedoch kaum negative Auswirkungen auf diese Zelllinie hatte. HeLa-Zellen wurden in einer 24-Wellplatte zu jeweils  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät und ü.N. unter Standardbedingungen inkubiert. Jeweils zwölf der Wells wurden anschließend mit 800  $\mu$ l Leucin-freiem HEPES-Medium mit pH 5,8 oder pH 7,4 gewaschen und mit 500  $\mu$ l des entsprechenden Mediums versetzt. Nach 20, 40, 60 und 120 min wurde die Zellmorphologie mikroskopisch überprüft. Je drei parallele Ansätze wurden über einen Zeitraum von 20 min mit 4  $\mu$ l/ml [ $^3$ H]-markiertem Leucin in 200  $\mu$ l

Hepes-Medium (pH 7,4) bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Leucin wurde anschließend durch zwei Waschschriffe mit 5% TCA entfernt. Nach 10-minütiger Zelllyse durch 0,1 M KOH wurde das Zelllysate in Plastik-„Vials“ überführt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Nach Mischen der Proben durch Vortexen wurde die Lichtemission in einem Szintillationszähler gemessen. Die Anzahl der eingebauten [<sup>3</sup>H]-gelabelten Leucinreste weist auf eine aktive Proteinbiosynthese hin und dient folglich als Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen. In Abbildung 60 ist die Proteinbiosynthese der entsprechend behandelten HeLa-Zellen in einem Balkendiagramm prozentual dargestellt, wobei die Proben nach 20 min bei pH 7,4 und 20°C auf 100 % gesetzt wurden.



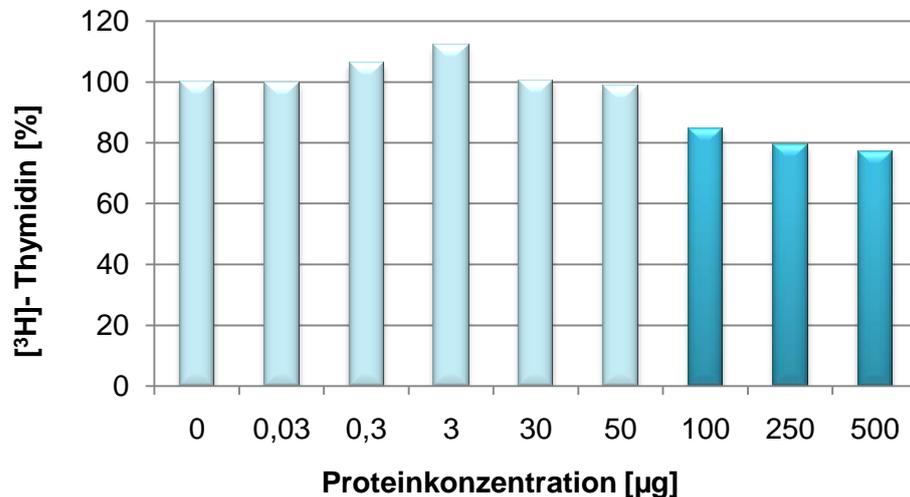
**Abbildung 60: Proteinsynthese-Messung von HeLa-Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten und 20°C.** Je  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 24-Wellplatte wurden über verschiedene Zeiträume bei 20°C in Leucin-freiem Hepes-gepuffertem Medium mit pH 7,4 oder pH 5,8 inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurde die Proteinsynthese durch Einbau von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Leucin quantifiziert und diente als Maß für die Lebensfähigkeit der HeLa-Zellen. Nach Fällung der Proteine mit 5 % TCA und Entfernen des ungebundenen Leucins wurden die Zellen mittels 0,1 M KOH-Lösung lysiert und die Menge des proteingebundenen radioaktiven Leucins im Zelllysate nach Mischen mit Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationszähler quantifiziert. Pro Inkubationsbedingung wurden drei parallele Ansätze gemessen und die Standardabweichung bestimmt.

Nach 40 und 60 min nahm die Proteinbiosynthese kaum ab. Die Werte lagen noch über 95 %. Mikroskopisch ließen sich zu beiden Zeitpunkten ebenfalls keine signifikanten Änderungen zwischen den beiden pH-Werten feststellen. Erst nach 2 h sank die Lebensfähigkeit deutlich, worauf die um mehr als 40 % gesenkte Proteinsynthese hindeutete. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich bereits über 50 % der Zellen in Medium mit pH 5,8 abgelöst, wohingegen die Mehrzahl der Zellen bei pH 7,4 noch gesund aussah. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Sandvig haben ergeben, dass Shiga Toxin innerhalb von 15 min von Säugerzellen internalisiert wird (Torgersen, M. L., persönliche Mitteilung). Daher konnte angenommen werden, dass eine 20-minütige Inkubation der HeLa-Zellen mit K28-Toxin zumindest für die Toxinbindung an die Zelloberfläche ausreichend sein sollte.

## 2.2 Bestimmung der optimalen Toxinkonzentration

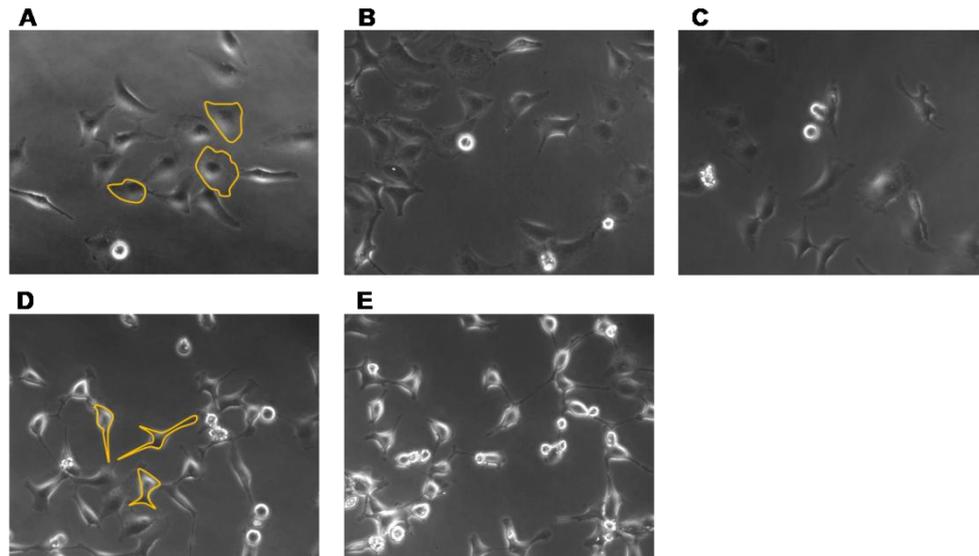
In einem nächsten Schritt sollte die optimale Toxinkonzentration ermittelt werden, die in HeLa-Zellen einen toxischen Effekt hervorruft. Da K28 in sensitiven Hefezellen einen Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase auslöst, der in einer Hemmung der DNA-Synthese resultiert (Schmitt *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2005), diente die Messung der DNA-Neusynthese als Toxizitäts-Assay. Das Versuchsprinzip entspricht dem der Proteinsynthese-Messung, mit dem Unterschied, dass den Zellen [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zum Einbau in die DNA zur Verfügung gestellt wird. Die genaue Durchführung ist unter Punkt 5 (Material und Methoden) aufgeführt. Da die Toxinkonzentration des unaufgereinigten Konzentrates höher war als nach Affinitätsreinigung und somit das zugegebene Volumen gering gehalten werden konnte, wurde dieses Konzentrat für die ersten Experimente eingesetzt. Ein weiterer Vorteil des unbehandelten Konzentrates war die größere Aktivität im Agardiffusionstest. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen (die Konzentration an K28-Toxin ist geringer) wurden zwischen 0,03 µg und 500 µg in einem Gesamtvolumen von jeweils 500 µl (verdünnt mit

Hepes-Medium, pH 5,8) variiert. Das Ergebnis der Toxizitätsmessung ist in Abbildung 61 grafisch dargestellt. Die DNA-Synthese der unbehandelten Kontrolle, die mit 500 µl Hepes-Medium (pH 5,8) 20 Minuten bei 20°C inkubiert wurde, wurde auf 100 % gesetzt.



**Abbildung 61: Toxizitäts-Assay von K28-behandelten HeLa-Zellen zur Bestimmung der optimalen Toxinmenge.** Je  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 24-Wellplatte wurden über 20 min bei 20°C in Hepes-gepuffertem Medium mit pH 5,8 inkubiert, wobei das K28-Toxinkonzentrat in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,03 µg und 500 µg zugesetzt wurden. Das Gesamtvolumen lag jeweils bei 500 µl. Von der Kontrolle wurden drei, von den Proben je zwei parallele Ansätze gemessen. Nach 20 Minuten wurde die Toxinlösung entfernt und durch normales Hepes-Medium (pH 7,4) ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen bei 30°C wurden die Zellen 2 h mit 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidin behandelt und die Menge des eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidins im Szintillationszähler quantifiziert. Die Thymidinmenge korreliert mit der Menge neusynthetisierter DNA und diente als Maß für die Toxinwirkung.

Erst ab einer Proteinkonzentration von 100 µg ließ sich eine Abnahme der DNA-Synthese nachweisen. Selbst nach Inkubation mit 500 µg Protein sank die DNA-Synthese lediglich um etwas über 20 %. Unmittelbar vor Zugabe des [<sup>3</sup>H]-Thymidins wurden Veränderungen in der Zellmorphologie der toxinbehandelten HeLa-Zellen mikroskopisch dokumentiert. Die entsprechenden Aufnahmen sind in Abbildung 62 dargestellt. Der Zustand der Zellen nach Toxinbehandlung entspricht weitgehend den Ergebnissen der DNA-Synthese-Messung.



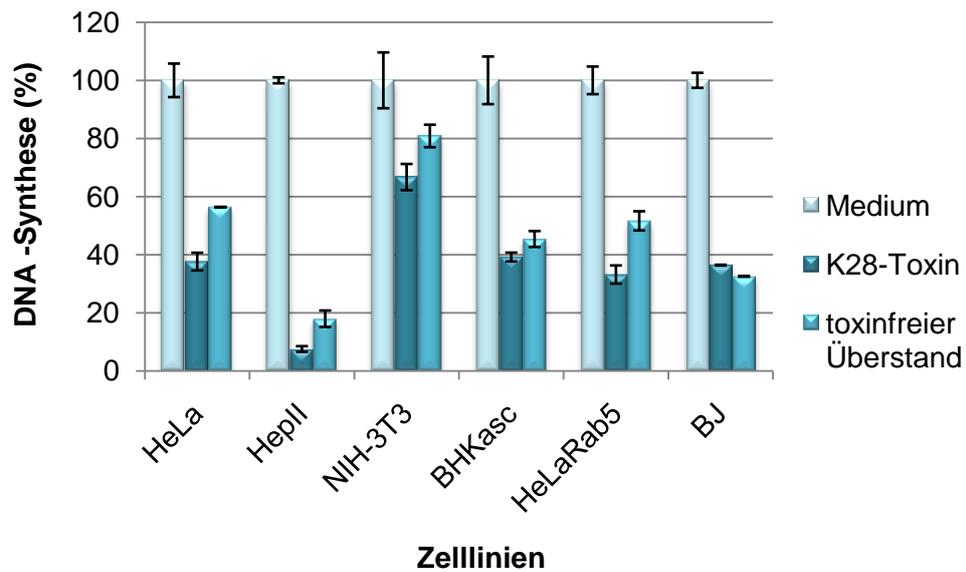
**Abbildung 62: Mikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie von HeLa-Zellen nach K28-Toxinbehandlung.** HeLa-Zellen wurden 20 Minuten bei 20°C in Hepes-Medium (pH 5,8) mit unterschiedlichen Konzentrationen an K28-Toxin inkubiert. Nach der Toxinbehandlung wurden die Zellen mit frischem Hepes-Medium (pH 7,4) versetzt und bei 30°C bebrütet. Nach 24 h wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet. Bild (A) zeigt die mit toxischem Hepes-Medium (pH 5,8) behandelten Kontrollzellen. Die übrigen Abbildungen zeigen K28-behandelte Zellen, wobei die Toxinkonzentration von (B) bis (E) ansteigt: (B) 50 µg, (C) 100 µg, (D) 250 µg, (E) 500 µg. Zur Verdeutlichung der veränderten Zellform sind einige Zellen der Kontrolle und nach Toxinbehandlung gelb umrandet.

Bei Behandlung mit 50 µg (Abbildung 62 B) oder 100 µg Protein (C) zeigten sich nur vereinzelt abgerundete, abgestorbene Zellen. Hier zeigte sich erst ab 250 µg ein deutlich toxischer Effekt; viele Zellen waren abgelöst und deformiert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen hatten die Zellen ihre kompakte Form verloren und sahen langgestreckt aus. Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die eingesetzten 250 µg Protein nicht 250 µg K28-Toxin entsprachen, erschien die benötigte Konzentration zu hoch zu sein. Zunächst musste daher überprüft werden, ob das Toxinkonzentrat den Transport unbeschädigt überstanden hat und nicht degradiert und/oder inaktiv war. Ein Aliquot wurde daher mittels SDS-PAGE in einem Gradientengel (4-20 % Precise Gel, Pierce) analysiert, um Degradation auszuschließen. Beide Toxinproben, das Konzentrat sowie die gereinigte Charge zeigten deutliche Toxin-Banden im Gel (Ergebnis nicht dargestellt). Zusätzlich

wurde ein Aliquot im Agardiffusionstest auf Aktivität getestet. Dabei zeigte sich, dass das Konzentrat zwar noch toxisch, die Aktivität jedoch leicht vermindert war (Ergebnis nicht dargestellt).

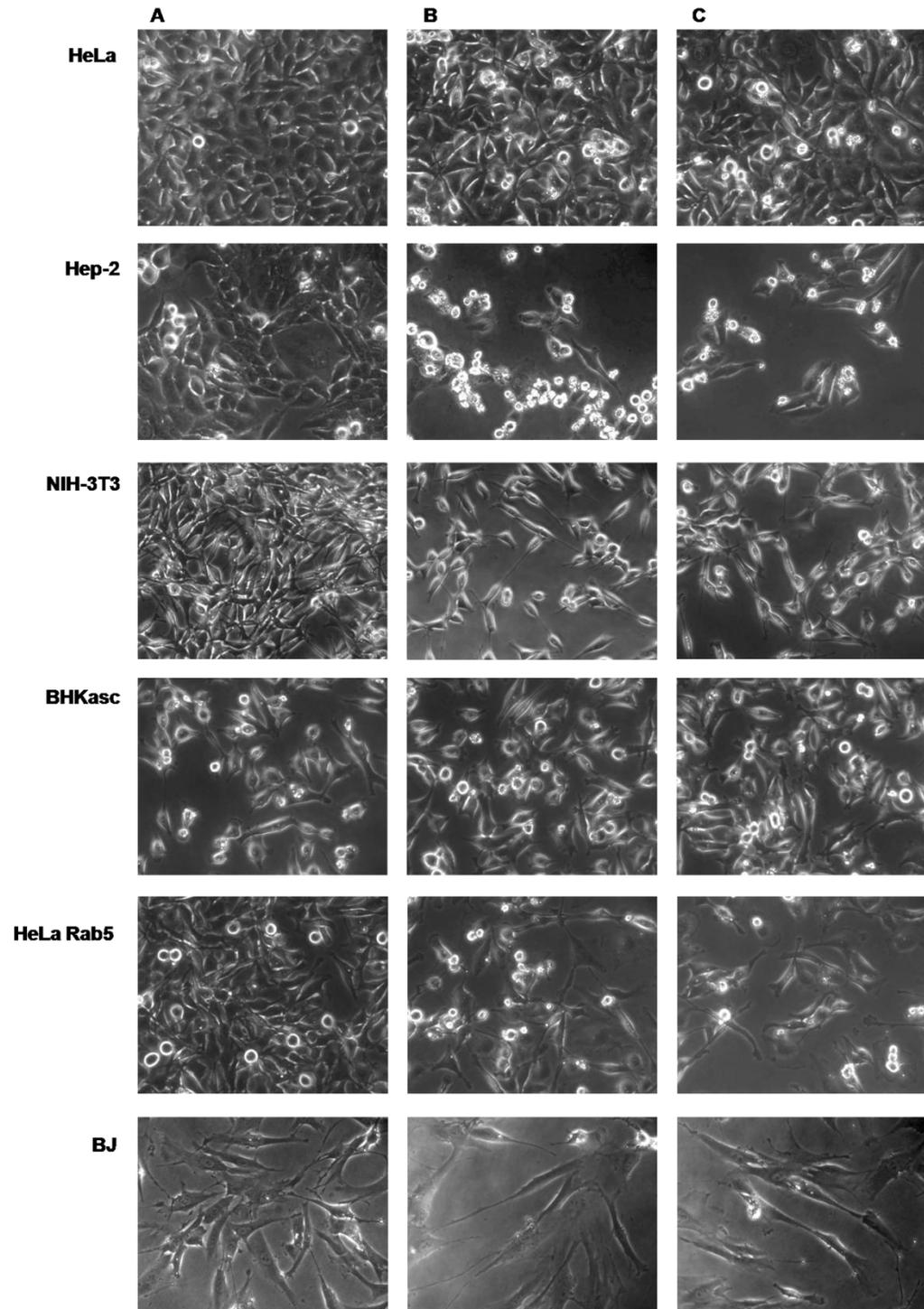
### **3. Untersuchungen zur Toxizität von K28-KDEL auf verschiedene Zelllinien**

In weiteren Untersuchungen sollte getestet werden, ob andere Zelllinien möglicherweise sensitiver auf das Toxin reagieren. Es wurden willkürlich fünf weitere Zelllinien ausgesucht, die nach Behandlung mit 250 µg Protein einem Toxizitäts-Assay unterzogen wurden. Diesmal erfolgte die Inkubation in HEPES-Medium bei pH 7,4. Die Inkubationszeit wurde auf 25 min erhöht und die ü.N. Inkubation erfolgte diesmal bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator, damit weniger Zellen durch die gewählten Kultivierungsbedingungen geschädigt wurden. Abhängig vom Zelltyp erfolgte die ü.N.-Inkubation in unterschiedlichen Medien, die der Tabelle 19 (Material und Methoden) zu entnehmen sind. In der Tat zeigte sich nun eine deutlich stärkere Hemmung der DNA-Synthese durch dieselbe Menge Toxin als bei Bebrütung der Zellen bei 30°C. Selbst in HeLa-Zellen war der Effekt deutlich erkennbar. Im Vergleich zur Pufferkontrolle, die jeweils auf 100 % gesetzt wurde, zeigten HeLa-Zellen nach Toxininkubation eine um 60 % reduzierte DNA-Synthese (Abbildung 63). Für die übrigen Zellen konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Während NIH-3T3-Zellen weniger sensitiv waren und noch etwa 70 % DNA-Synthese zeigten, erwiesen sich Hep-2-Zellen am sensitivsten. Im Vergleich zur Mediumkontrolle war die DNA-Synthese hier um über 90 % verringert. Völlig unerwartet führte allerdings die Inkubation mit toxinfreiem *K. lactis*-Überstand in ähnlicher Weise zu einer Hemmung der DNA-Synthese. Die Toxizität des eigentlichen Toxins war dabei lediglich um 10 % höher als die des Überstandes.



**Abbildung 63: DNA-Synthese-Messung unterschiedlicher Zelllinien nach Behandlung mit K28-Toxinkonzentrat.** Je  $4 \times 10^4$  Zellen unterschiedlicher Zelllinien wurden 25 min bei 20°C mit Hepes-gepuffertem Medium (pH 7,4) unter Zusatz von 250 µg Toxin, einem entsprechenden Volumen toxinfreiem Überstand oder reinem Medium (Gesamtvolumen 500 µl) inkubiert. Die DNA-Synthese wurde in je zwei Parallelen gemessen. Nach Entfernen der Toxinlösung erfolgte eine 24-stündige Inkubation in normalem Medium (pH 7,4) bei 37°C. Die Art des Mediums wurde auf die jeweilige Zelllinie angepasst. Nach Inkubation der Zellen bei 30°C wurden die Zellen 2 h mit 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidin behandelt und die Menge des eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidins im Szintillationszähler quantifiziert.

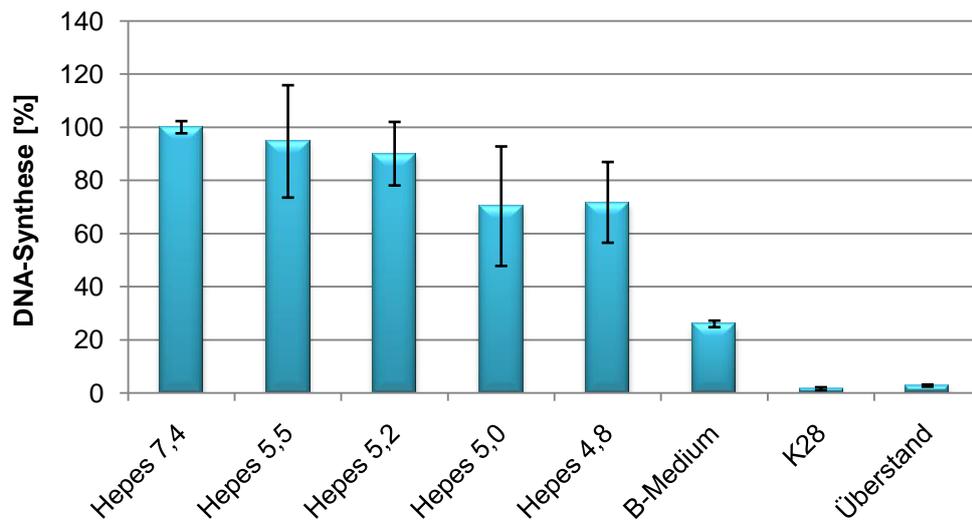
Diese Ergebnisse konnten mikroskopisch bestätigt werden (Abbildung 64). Nach Inkubation mit Toxin oder toxinfreiem Überstand waren viele Zellen abgerundet oder vollständig verschwunden. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei Hep-2 Zellen.



**Abbildung 64: Mikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie von HeLa- und Hep-2-Zellen nach K28-Toxinbehandlung.** Je  $4 \times 10^4$  Zellen unterschiedlicher Zelllinien wurden 25 Minuten bei  $20^\circ\text{C}$  in Hepes-Medium (pH 7,4) mit K28-Toxin ( $250 \mu\text{g}$  Protein) oder entsprechendem Volumen toxischem Überstand inkubiert. Nach der Toxinbehandlung wurden die Zellen mit normalem Medium (pH 7,4) versetzt (die Art des Mediums war abhängig vom jeweiligen Zelltyp). Bebrütet wurden die behandelten Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Inkubator. Nach 24 h wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet. Bild (A) zeigt jeweils die Mediumkontrolle, (B) die Kontrolle mit toxischem Überstand und (C) zeigt die Zellen nach Behandlung mit K28-Toxin.

#### 4. Fehlersuche: worauf beruht die Toxizität des toxinfreien *K. lactis*-Überstandes?

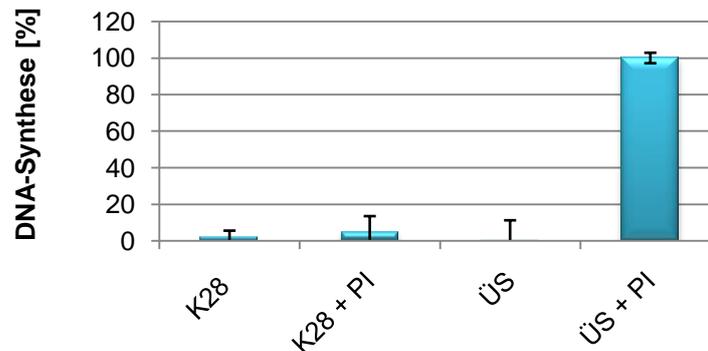
Die nächste Aufgabe bestand nun darin, die Ursache für die Toxizität des toxinfreien *K. lactis* Überstandes zu ermitteln. Zunächst sollte erneut der Einfluss des pH-Wertes auf die DNA-Synthese in HeLa-Zellen überprüft werden, da davon auszugehen war, dass aufgrund der Zugabe von Toxinkonzentrat mit einem pH-Wert von 4,7 der pH-Wert des Hepes-Mediums (pH 5,8 oder 7,4) weiter gesenkt wurde, da die Pufferwirkung von Hepes nur im neutralen Bereich gewährleistet ist. Folglich ist reines Medium mit dem entsprechenden pH möglicherweise keine geeignete Kontrolle. Daher wurde zunächst der pH der jeweiligen Inkubationslösungen mit pH-Teststreifen bestimmt und der Einfluss des pH-Wertes auf die DNA-Synthese von HeLa-Zellen untersucht. Die Zellen wurden zu diesem Zweck analog zu obigen Experimenten behandelt, wobei die Inkubation in Hepes-Medium verschiedener pH-Werte zwischen 7,4 und 4,7 erfolgte. Die Ergebnisse sind Abbildung 65 zu entnehmen. Unterhalb von pH 5,8 ergab sich eine signifikante Reduktion der DNA-Synthese erst ab etwa 5,0. Hier war der Einbau von [3H]-Thymidin im Vergleich zu normalen pH-Bedingungen (pH 7,4) um 30 % verringert. Bei pH 4,7 änderte sich dieser Wert kaum. Im Gegensatz dazu induzierten sowohl das Toxin als auch der toxinfreie Überstand eine sehr starke DNA-Synthese-Hemmung von über 90 %. Dazu ist zu sagen, dass hier ein neues Toxinkonzentrat mit höherer Aktivität zum Einsatz kam. Der *K. lactis* Überstand wurde parallel unter denselben Bedingungen hergestellt. Da die Anzucht der Hefe zur Herstellung des Toxinkonzentrates in synthetischem B-Medium (pH 4,7) erfolgte, wurde parallel der Einfluss dieses Mediums auf die DNA-Synthese von HeLa-Zellen untersucht. Interessanterweise ergab sich alleine durch das Medium eine Hemmung um 70 %.



**Abbildung 65: DNA-Synthese-Messung von HeLa-zellen nach Inkubation mit Hepes-Medium unterschiedlicher pH-Werte.** Je  $4 \times 10^4$  HeLa-Zellen wurden 20 min bei  $20^\circ\text{C}$  mit Hepes-gepuffertem Medium verschiedener pH-Werte inkubiert. Die DNA-Synthese wurde in je zwei parallelen Ansätzen gemessen. Nach Austausch des Hepes-Mediums durch Bicarbonat-Medium (DMEM) erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ . Die Zellen wurden dann bei  $30^\circ\text{C}$  die Zellen 2 h mit  $1 \mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Thymidin behandelt und die Menge des eingebauten  $^3\text{H}$ -Thymidins im Szintillationszähler quantifiziert.

In einem zusätzlichen Experiment sollte untersucht werden, ob der toxische Effekt des Überstandes auf Proteasen im zellfreien Kulturüberstand von *K. lactis* zurückzuführen sein könnte. Dazu wurden K28-Toxin und Überstand vor der Inkubation mit HeLa-Zellen mit einem Proteaseinhibitor (PI)-Cocktail behandelt. Die Wirkung entsprechender Proben vor und nach PI-Behandlung auf die DNA-Synthese wurde wie üblich bestimmt. Die Ergebnisse sind Abbildung 66 zu entnehmen. Im Vergleich zum PI-behandelten Überstand, der auf 100 % gesetzt wurde, zeigte der unbehandelte *K. lactis*-Überstand eine Hemmung von über 95 %. Im Gegensatz dazu ließ sich bei dem K28-Toxinkonzentrat die Toxizität durch Inaktivierung der Proteasen nicht verhindern, es konnte lediglich eine Steigerung der DNA-Synthese um 2,5 % beobachtet werden. Demnach scheinen tatsächlich im Kulturüberstand vorhandene Proteasen für die Hemmung der DNA-Synthese durch die Negativkontrolle verantwortlich zu sein. Bei dem Toxinkonzentrat war

hingegen kein Toxizitätsrückgang nach PI-Behandlung detektierbar. Demzufolge überlagert die Toxinaktivität die Wirkung der Proteasen, was wiederum bedeutet, dass K28 auf HeLa-Zellen toxisch wirkt und, wie in Hefen, eine Hemmung der DNA-Synthese induziert.



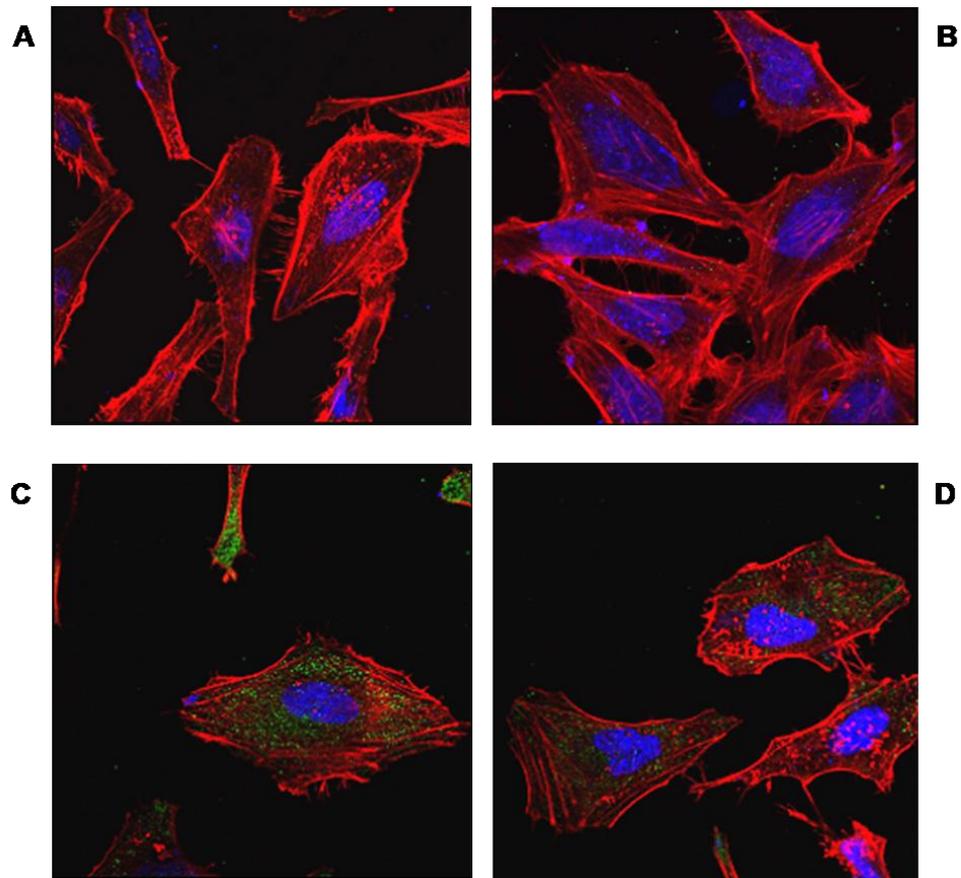
**Abbildung 66: Untersuchung des Einflusses von Proteasen im Kulturüberstand auf die DNA-Synthese von HeLa-Zellen.** Je  $4 \times 10^4$  HeLa-Zellen wurden 20 min bei 20°C Toxinkonzentrat und dem toxinfreien Überstand inkubiert. Dabei wurden von Toxin und Kontrolle jeweils unbehandelte und mit Proteaseinhibitor-Cocktail versetzte Proben getestet. Die DNA-Synthese wurde in je zwei parallelen Ansätzen gemessen. Nach Austausch des Hepes-Mediums durch Bicarbonat-Medium (DMEM) erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen bei 30°C wurden die Zellen 2 h mit 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidin behandelt und die Menge des eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidins im Szintillationszähler quantifiziert.

## 5. Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis einer Toxinbindung/-internalisierung

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz sollte untersucht werden, ob K28 von HeLa-Zellen internalisiert wird oder zumindest in der Lage ist, an die Zellen zu binden. Für die Färbung wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 4-Wellplatten ausgesät, in denen sich zwei runde Deckgläser befanden, auf denen die Zellen adhärten. Die Zellen wurde analog zum Toxizitäts-Assay behandelt, um später die Ergebnisse vergleichen zu können. Nach einem Waschschrift mit 800 µl Hepes-Medium (pH 7,4) wurden die Zellen mit der entsprechenden Toxin- (250 µg) oder Kontrolllösung 20 Minuten bei 20°C inkubiert. Überschüssiges K28

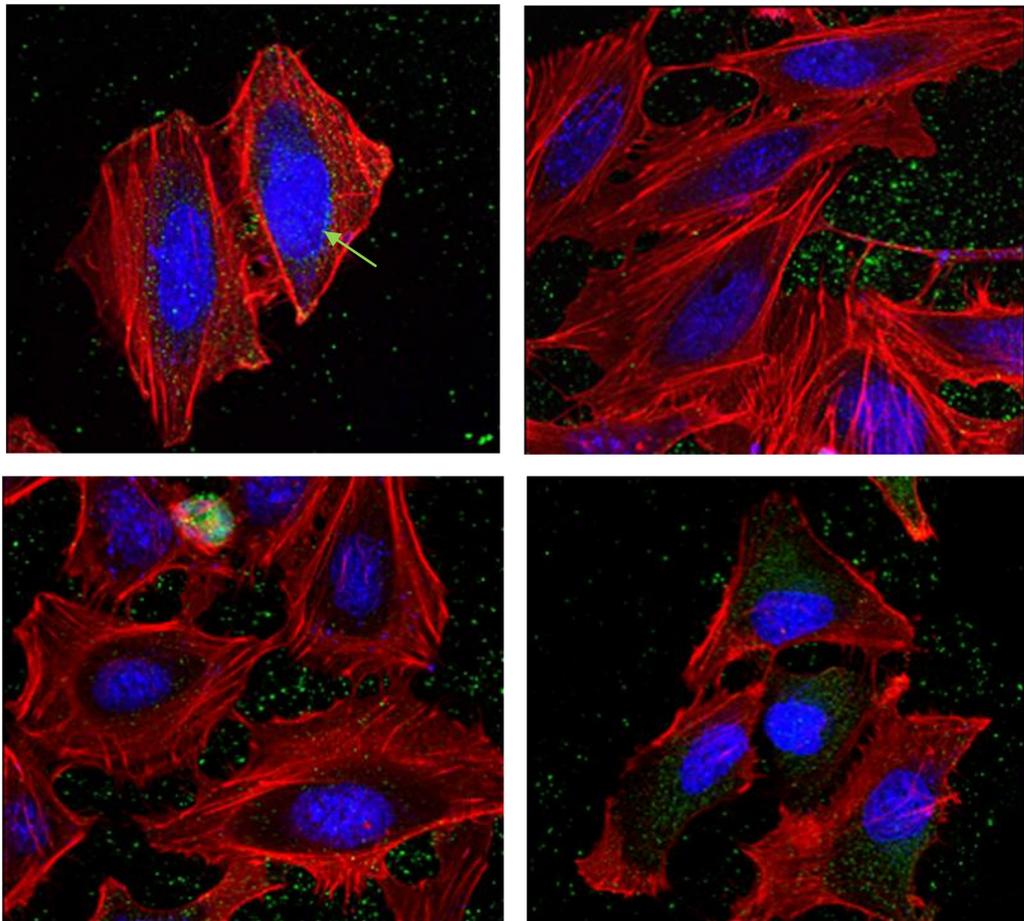
wurde anschließend in mehreren Waschschritten mit PBS-Puffer entfernt. Die Fixierung der Zellen erfolgte über 20 Minuten mit 300 µl Formalin bei 37°C. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100/PBS permeabilisiert und erneut gewaschen. Zum Abblocken unspezifischer Bindestellen wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten auf 15 µl Blockingpuffer (auf Parafilm) pipettiert und eine Stunde inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper ebenfalls für eine Stunde. Der anti-K28 Antikörper wurde 1:100 in Blockingpuffer verdünnt und 15 µl dieser Antikörperlösung pro Deckglas eingesetzt. Die Zellen wurden dann dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen, und 45 min mit sekundärem Cy2-gelabeltem anti-„Rabbit“ Antikörper (1:200) und Rhodamin-Phalloidin (1:100) im Dunkeln inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde überschüssiger Antikörper durch vier Waschschriffe von 10 Minuten entfernt. Zum Schluss wurde der Zellkern 6 Minuten bei 37°C mit DRAQ5<sup>TM</sup> gefärbt, die Zellen mit ProLong Gold überschichtet und auf einen Objektträger überführt.

Es stellte sich heraus, dass der FLAG-Antikörper für indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von Säugerzellen ungeeignet ist, da dieser Antikörper ein Epitop auf der Oberfläche der Zellen mit großer Affinität bindet (Wesche, J., persönliche Mitteilung), wodurch falsche Signal entstanden. Auch die gegen die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheit gerichteten Antikörper waren nicht geeignet, da sie zu schwache und zudem äußerst unspezifische Signale erzeugten (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ergebnisse der Immunfärbung mit anti-K28-Antikörper sind in den Abbildungen 67 und 68 dargestellt. Das Aktincytoskelett ließ erkennen, dass die Zellmorphologie normal war. Auch die Zellkerne waren deutlich angefärbt und zeigten keine Anzeichen einer fortgeschrittenen Apoptose. Während in der unbehandelten Kontrolle und der Kontrolle mit toxfreiem Überstand nur wenige grün fluoreszierende Punkte in den Zellen detektierbar waren, zeigten die Kontrollen mit Hepes-Medium deutliche Fluoreszenz. Ein „Z-Stack“ ergab, dass die grünen punktförmigen Strukturen in allen Kontrollen innerhalb der Zellen und nicht etwa an der Oberfläche lokalisiert waren.



**Abbildung 67: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach indirekter Immunfärbung un behandelter Kontrollzellen mit anti-K28-Antikörper.** Die Aufnahmen zeigen die Negativkontrollen: (A) unbehandelte Zellen, (B) Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit toxin-freiem *K. lactis* Überstand. Die übrigen Fotos zeigen Zellen nach Inkubation in Hepes-Medium mit pH 5,0 (C) und pH 7,4 (D). Die Zellen wurden mit Formalin fixiert, permeabilisiert und mit primärem anti-K28 Antikörper (1:100) und sekundärem Cy2-gekoppeltem anti-„Rabbit“-Antikörper (1:200) behandelt. Das Aktincytoskelett wurde mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin (1:100) gefärbt, die DNA des Zellkerns wurde mit DRAQ5™ sichtbar gemacht. Die Fotos wurden mit dem konfokalen LSM 700 (Zeiss) aufgenommen. Hier sind die „Overlays“ dargestellt.

Dasselbe Ergebnis war auch bei HeLa-Zellen zu beobachten, die mit 250 µg Toxin behandelt wurden. Hier fiel allerdings auf, dass sich außerhalb der Zellen Antikörper-Toxin-Aggregate bildeten, die durch die Waschschriffe nicht vollständig entfernt werden konnten. Die grüne Fluoreszenz des sekundären Antikörpers war in einigen Zellen sehr stark. Bei genauerem Hinsehen, schienen einige der Punkte vermehrt um den Zellkern angesammelt zu sein (Abbildung 68, siehe Pfeil linkes oberes Foto). Da jedoch schon die Kontrollen mit Medium ohne K28 falsch positive Ergebnisse lieferten, ist die Aussagekraft der Aufnahmen nicht sehr hoch.



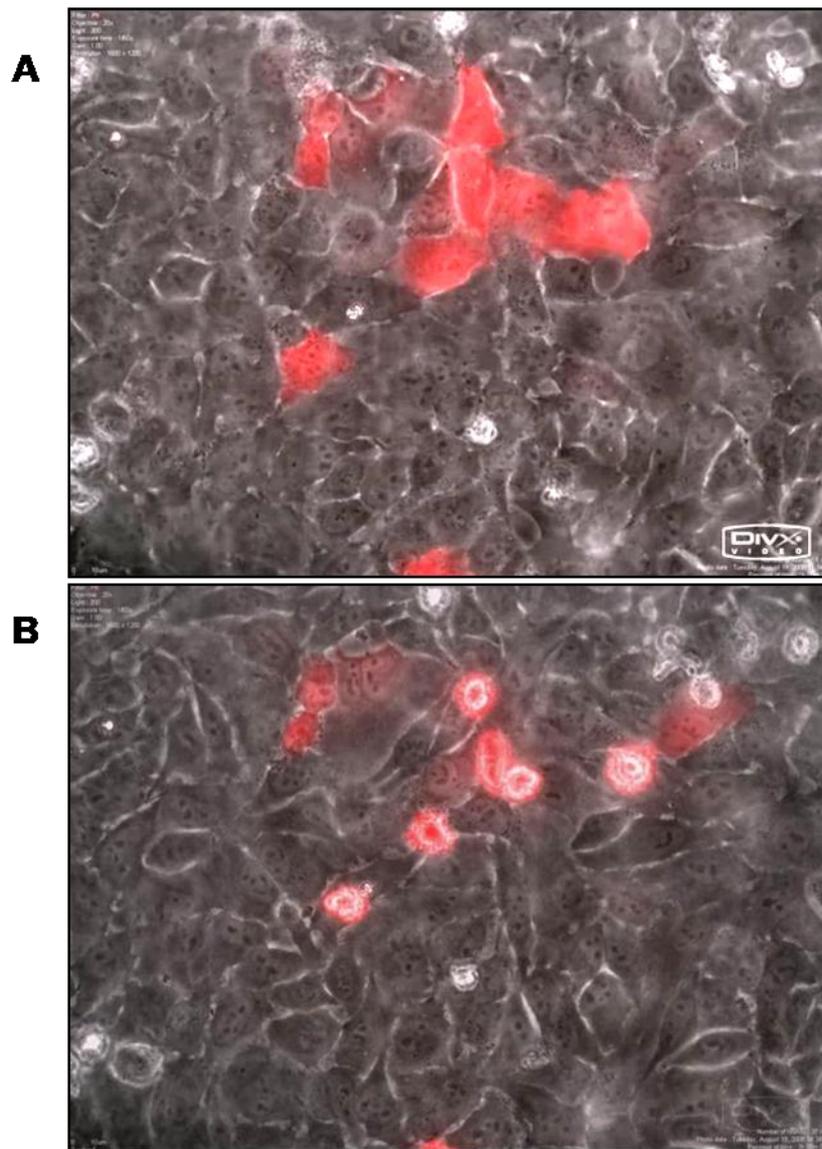
**Abbildung 68: Fluoreszenzmikroskopie K28-behandelter HeLa-Zellen nach indirekter Immunfärbung mit anti-K28-Antikörper.** Die Aufnahmen zeigen HeLa-Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit K28-Toxinkonzentrat (250 µg)/Hepes (pH 7,4). Die Zellen wurden mit Formalin fixiert, permeabilisiert und mit primärem anti-K28 Antikörper (1:100) und sekundärem Cy2-gekoppeltem anti-„Rabbit“-Antikörper (1:200) behandelt. Das Aktincytoskelett wurde mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin (1:100) gefärbt, die DNA des Zellkerns wurde mit DRAQ5™ sichtbar gemacht. Die Fotos wurden mit dem konfokalen LSM 700 (Zeiss) aufgenommen. Hier sind die „Overlays“ dargestellt.

## 6. Mikroinjektions-Experimente

Da es bislang nicht gelungen war, eindeutig nachzuweisen, ob K28 auf Säugerzellen toxisch wirkt oder überhaupt internalisiert wird, wurden darüber hinaus Mikroinjektionsexperimente durchgeführt. HeLa- und Hep-2-Zellen bekamen zu diesem Zweck direkt Toxinkonzentrat beziehungsweise Puffer oder toxinfreien Überstand in das Cytoplasma injiziert. Diese Experimente wurden mit Unterstützung von Dr. Sascha Pust durchgeführt.

Die Zellen wurden in speziellen Kulturschalen ausgesät, die in der Mitte ein kleines Loch besitzen, das durch ein Deckglas abgedichtet ist. An dieser Stelle ist der Boden dünn genug, um die Zellen direkt in der Schale mikroskopisch zu betrachten. Die Injektion erfolgte bei 40-facher Vergrößerung mit Hilfe steriler „Femotips“. Injiziert wurden entweder Kontrollpuffer (Tris-HCl, pH 7,4), K28-Konzentrat (1:10 verdünnt in Tris-HCl) oder die ebenso verdünnte Überstandskontrolle. Um die injizierten Zellen von den nicht injizierten unterscheiden zu können wurde der Injektionslösung zusätzlich Dextran-TexRed zugefügt, so dass eine rote Färbung sichtbar war. Dextran hat den Vorteil, dass es nicht an Tochterzellen weitergegeben wird und konstant im Cytoplasma bleibt.

Anhand der Intensität der Färbung lässt sich zudem das injizierte Volumen einzelner Zellen untereinander vergleichen. Es sah in der Tat so aus, dass durch Injektion beider Kontrollen relativ wenige Zellen gestorben sind und meist nur solche, die ein großes Volumen injiziert bekamen, wohingegen sich K28-behandelte Zellen eher ablösten. Die Form der abgekugelten Zellen ließ hierbei auf einen apoptotischen Zelltod schließen (Pust, S., persönliche Mitteilung). Nach Injektion wurden die Zellen sofort in eine BioStation überführt und über einen Zeitraum von drei Stunden gefilmt. Jeweils drei Positionen pro Schale wurden gleichzeitig aufgenommen. In Abbildung 69 sind K28-behandelte Hep-2 Zellen unmittelbar nach Toxininjektion (A) und drei Stunden später (B) dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass etwa die Hälfte der injizierten Zellen nach drei Stunden abgestorben ist.



**Abbildung 69: Mikroskopische Aufnahme von Hep-2 Zellen nach Mikroinjektion von K28-Toxin.** Hep-2 Zellen wurden mit „Femotips“ bei einer 40-fachen Vergrößerung mit K28-Toxinkonzentrat in Tris-HCl (pH 7,4) injiziert. Der Injektionslösung wurde mit Dextran-TexRed zugefügt, um injizierte von den übrigen Zellen unterschieden zu können. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in die Kammer einer BioStation (Nikon) gestellt über einen Zeitraum von drei Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gefilmt. Foto (A) zeigt die Zellen zum Zeitpunkt Null, direkt nach Injektion und (B) dieselben Zellen nach 3 h.

## IV Diskussion

Da das aus *S. cerevisiae* stammende Killertoxin K28 viele Gemeinsamkeiten zu bakteriellen A/B-Toxinen aufweist, die teilweise starke Virulenzfaktoren darstellen, war das Ziel dieses Projektes, eine mögliche Toxizität von K28 auf humane Zellen zu untersuchen. Bereits 2004 wurden Versuche zur Aufklärung toxischer Effekte auf Säugerzellen unternommen, diese scheiterten jedoch aufgrund der gewählten Versuchsbedingungen (Spindler, 2004).

Um die Aufnahme des K28-Toxins in Säugerzellen zu erleichtern, wurde ein Toxinderivat hergestellt, das anstelle des HDEL-Motivs das in Säugern eher gängige Sortiersignal KDEL (Pelham, 1989) am  $\beta$ -C-Terminus trägt. Dieses Konstrukt wurde ausgehend von einer FLAG-His-getaggeten Variante amplifiziert (Guida, 2007) und zur heterologen Expression in das Genom der Milchhefe *K. lactis* integriert, wo es unter der Transkriptionskontrolle des *LAC4*-Promotors vorliegt. Das Konstrukt wurde so restringiert, dass es in den Integrationsvektor pKLAC1 „in frame“ hinter das Sekretionssignal des *K. lactis* eigenen  $\alpha$ -„mating“ Faktors einkloniert wurde. Nach Expression von K28MF-ptox-KDELRL-FLAG-(His)<sub>6</sub> wurde das Toxin mittels Ultrafiltration konzentriert und anschließend affinitätschromatografisch gereinigt. Als Negativkontrolle diente ein ebenso konzentrierter Kulturüberstand einer *K. lactis*-Transformante mit pKLAC1-Leervektor.

Killertoxine verleihen den produzierenden Hefen in ihrem natürlichen Habitat einen Überlebensvorteil gegenüber sensitiven Hefen derselben oder verwandter Gattungen (Starmer *et al.*, 1987). Ihr Temperatur- und pH-Optimum ist daher an die Wachstumsbedingungen von Hefekulturen angepasst. Aus früheren Untersuchungen ging hervor, dass K28 die größte Aktivität bei 20°C besitzt und die Toxizität durch längere Inkubation bei einer Temperatur oberhalb von 30°C deutlich abnimmt (Spindler, 2004). Säugerzellen reagieren ebenfalls sehr sensitiv auf Temperaturschwankungen, wobei ihr Temperaturoptimum

mit 37°C über dem des Toxins liegt. Darüber hinaus ist die Zellbindung von K28 pH-sensitiv. Spindler konnte nachweisen, dass sich diese pH-Abhängigkeit auf der Ebene der Plasmamembran manifestiert, da sich im Agardiffusionstest auch Sphäroplasten bei neutralem pH-Wert toxinresistent verhalten. Anhand von Internalisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass exogen appliziertes Toxin bei neutralen pH-Bedingungen einerseits schwächer internalisiert wird als bei einem optimalen pH-Wert von 4,7 und zudem der größte Prozentsatz des aufgenommenen Toxins anstatt ins Cytosol in die Vakuole gelangt (Spindler, 2004). Mit Hilfe von Agardiffusionstests wurde gezeigt, dass K28 bei pH 5,5 noch vollständig aktiv ist, wohingegen die Toxizität bei pH 5,8 bereits stark vermindert und K28 ab einem pH von 6,0 komplett inaktiv ist (Sehn, 2005; Spindler, 2004). Diese pH-Sensibilität könnte mit der Bindung des Killertoxins an den HDEL-Rezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran assoziiert sein. Wilson *et al.* konnten bereits vor über 15 Jahren nachweisen, dass die Bindung von KDEL an seinen Rezeptor *in vitro* pH-abhängig ist und vermuteten, dass die Erd2p-vermittelte ER-Retention luminaler ER-Proteine durch pH-Unterschiede innerhalb der einzelnen sekretorischen Kompartimente begünstigt wird. Nach Expression von Erd2p in COS-Zellen erfolgte eine spezifische Bindung von <sup>125</sup>I-YTFEHDEL an COS-Membranen am optimalsten in einem pH-Bereich zwischen 5,0 und 5,5. Bei neutralem pH konnte eine Freisetzung von dem Rezeptor beobachtet werden (Wilson *et al.*, 1993). Aus diesen Ergebnissen und der Annahme, dass der pH-Wert innerhalb des Sekretionsweges vom ER, mit fast neutralem pH (Mellman *et al.*, 1986), in Richtung *trans*-Golgi, wo ein pH von 5,8 vermutet wird (Anderson und Pathak, 1985), abnimmt, lässt sich ableiten, dass die Affinität von Erd2p für H/KDEL in einem späten Golgi-Kompartiment am stärksten ist und im ER-Lumen so schwach ist, dass es zur Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes und folglich zur Freisetzung des Proteins im ER kommt. Säugerzellen werden standardmäßig bei einem pH-Wert von 7,4 kultiviert. Untersuchungen von Spindler zur Wirkung von K28 auf HCT-116-Zellen

(humane Colonkarzinom-Zellen) zeigten, dass die meisten Kontrollzellen bereits durch die Inkubation mit dem gewählten Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,7) abgetötet wurden, im Vergleich zur Kontrolle konnte kein Einfluss des K28-Toxins nachgewiesen werden. In diesem früheren Experiment wurden HCT116-Zellen bei Raumtemperatur ein bis zwei Stunden mit reinem Toxin oder Kontrollpuffer inkubiert, abtrypsinisiert und nach Propidiumiodid-Färbung der DNA-Gehalt durchflusscytometrisch bestimmt, um Hinweise auf Apoptose oder einen Zellzyklusarrest zu erhalten (Spindler, 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollten die früheren Versuchsbedingungen optimiert werden. Es galt einen Kompromiss zu finden. Durch die gewählten Inkubationsbedingungen sollte einerseits die Lebensfähigkeit der Zellen gewährleistet sein und gleichzeitig die Aktivität des Toxins erhalten bleiben. In einem Vorversuch wurde der Einfluss von Temperatur und pH auf HeLa-Zellen getestet, um einen Hinweis zu erhalten, wie lange eine Inkubation der Zellen mit K28-Toxinkonzentrat sinnvoll ist. Da K28 bei pH 5,8 noch Restaktivität besitzt (Spindler, 2004), wurde der Einfluss dieses pH-Wertes im Vergleich zum Standard-pH von 7,4 getestet. Jeweils  $4 \times 10^4$  Zellen aus ü.N.-Kulturen wurden mit 500 µl HEPES-Medium mit entsprechendem pH versetzt und 20, 40, 60 und 120 Minuten bei 20°C inkubiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Messung der Proteinbiosynthese bestimmt, indem die Zellen nach Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-markiertem Leucin gefüttert wurden. Die Menge des eingebauten Leucins wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers quantifiziert. Erst nach 120 Minuten zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proteinsynthese. Aufnahmestudien anderer A/B-Toxine hatten ergeben, dass Stx oder CT bereits nach 15 Minuten endozytotisch internalisiert werden (Torgersen, M.L., persönliche Mitteilung). Demnach sollte eine 20-minütige Inkubation ausreichend sein, um zumindest die Toxinbindung an die Zelloberfläche zu ermöglichen.

Das Killertoxin K28 tötet sensitive Hefen durch schnelle Inhibierung der DNA-Synthese, mit der ein langsamer Verlust der Lebensfähigkeit einher geht. Die Zellen arretieren in der frühen S-Phase des Zellzyklus mit einer mittelgroßen Knospe und einem einzigen Zellkern in der Mutterzelle mit einfachem DNA-Gehalt (1n) (Schmitt *et al.*, 1996). Zur Analyse der toxischen Wirkung von K28 auf Säugerzellen wurde daher der Einfluss des Toxins auf die DNA-Synthese untersucht und 24 Stunden nach Toxinbehandlung der Einbau radioaktiv markierten Thymidins in neu synthetisierte DNA gemessen. Als erstes wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Toxin behandelt, um eine Idee zu bekommen, ob überhaupt eine Abnahme der DNA-Synthese messbar ist und in welcher Konzentration das Toxin eingesetzt werden muss. Die Konzentration an Gesamtprotein des K28-Konzentrates wurde zwischen 0,03 und 500 µg variiert, wobei die eigentliche Toxinkonzentration unterhalb dieser Werte lag, da selbst nach Reinigung über eine Trap-His-Säule nicht alle unspezifischen Proteine aus dem Konzentrat entfernt werden konnten. Womöglich erklärt das auch, warum erst ab 250 µg eine Hemmung der DNA-Synthese zu beobachten war – das zugefügte Volumen an Toxinkonzentrat war hier mit etwa 160 µl in einem Gesamtvolumen von 200 µl relativ hoch. Eine mikroskopische Betrachtung der Zellen 24 Stunden nach der Toxinbehandlung bestätigte die Ergebnisse des Toxizitäts-Assays. Demnach waren erst bei 250 µg Veränderungen der Zellmorphologie und ein Ablösen der Zellen zu beobachten. Mittels Coomassie-Färbung des im SDS-Gel aufgetrennten Toxinkonzentrates und mittels Agardiffusionstest konnte gezeigt werden, dass das verwendete Toxinkonzentrat noch biologisch aktiv war. Allerdings war die Aktivität im Agardiffusionstest, vermutlich aufgrund der Transportbedingungen, vermindert. Aufgrund der Tatsache, dass ein relativ großes Volumen an Toxinkonzentrat zugegeben werden musste, um überhaupt einen Effekt zu erzielen, und da die Hefen zur Toxinsekretion in synthetischem Medium bei pH 4,7 angezogen wurden, war zu erwarten, dass nach Zugabe des Toxinkonzentrates zu

Hepes-Medium der pH-Wert entsprechend sinkt. Darauf deutete bereits der Farbumschlag des Indikators Phenolrot von rot nach gelb hin. Da der pH-Wert bei Verwendung von Hepes-Medium mit pH 5,8 nach Toxinzugabe vermutlich unter diesem Wert liegt, wurde das Toxin zu normalem Hepes-Medium mit pH 7,4 pipettiert. Um die Zellen nicht zusätzlich zu strapazieren, erfolgte die ü.N. Inkubation nun unter Standardbedingungen bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Unter den genannten Bedingungen blockierte K28 in HeLa-, BHK- und BJ-Zellen die DNA-Synthese um etwa 60 %. Während NIH-3T3-Zellen weniger sensitiv waren, zeigten sich Hep-2 Zellen am anfälligsten gegen das Toxin. Hier waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lediglich noch 10 % neusynthetisierte DNA messbar. Als eigentliche Kontrolle diente in diesen Experimenten toxinfreier *K. lactis* Überstand, der analog zum Toxinkonzentrat eingengt wurde. Völlig unerwartet hemmte dieser toxinfreie Überstand die DNA-Synthese aller getesteten Zelllinien in ähnlicher Weise wie das Toxin. Die Wirkung des K28-Toxins war gerade einmal 10 % stärker als die Toxizität der Negativkontrolle. Auch hier konnten die Ergebnisse der Toxizitäts-Assays mikroskopisch bestätigt werden. Bei allen Zelltypen kam es durch die Behandlung mit Toxin oder toxinfreiem Überstand zu einem Zellverlust. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei den toxinbehandelten Hep-2 und HeLa-Zellen.

Die toxische Wirkung des konzentrierten Kulturüberstandes könnte verschiedene Ursachen haben. Obwohl die pH-Sensitivität von HeLa-Zellen durch Inkubation mit Hepes-Medium (pH 5,8) getestet wurde, könnte der niedrige pH dennoch zur Abtötung der unterschiedlichen Zellen führen, da ein relativ großes Volumen des Konzentrates oder Überstandes eingesetzt wurde, das aufgrund des sauren pH-Wertes von 4,7 die Azidität der Inkubationslösung weiter verstärkt. Mit Hilfe von pH-Teststreifen konnte nachgewiesen werden, dass der pH-Wert von 7,4 auf 5,0 reduziert war. Es wurde daher Hepes-Medium unterschiedlicher pH-Werte hergestellt, die zwischen 5,5 und 4,7 variiert wurden. Parallel zu diesen Kontrollmedien wurde die Wirkung von

B-Medium (pH 4,7) auf HeLa-Zellen untersucht. Dabei handelte es sich um dasselbe Medium, in dem die transformierte Milchhefe zur Toxinproduktion angezogen wurde. Nach der Messung der DNA-Synthese entsprechend behandelter HeLa-Zellen war die Menge des eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidins bei pH 5,0 und pH 4,7 um gerade einmal 30 % verringert im Vergleich zu einer Reduktion um über 90 % durch das eingesetzte Toxinkonzentrat (hierbei handelte es sich um eine neue Charge, da das zuvor benutzte Toxinkonzentrat fast aufgebraucht war) oder den entsprechenden Überstand. B-Medium alleine führte ebenfalls zu einer starken Hemmung der DNA-Synthese. Die Toxizität dieses Mediums führte zu einer Reduktion der DNA-Synthese um etwa 70 % und war somit signifikant höher als der Effekt, der durch HEPES-Medium (pH 4,7) hervorgerufen wurde, jedoch weniger stark als die Hemmung durch Toxin oder Überstand. Folglich ist die Toxizität nicht nur auf die Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,0 zurückzuführen. Die Zusammensetzung des B-Mediums scheint das Wachstum der Säugerzellen negativ zu beeinflussen. Beim Vergleich der Zusammensetzung beider Medien fällt auf, dass viele Inhaltsstoffe von B-Medium in z.T. wesentlich höherer Konzentration vorhanden sind, als in DMEM. Insbesondere die Menge an Kupfersulfat ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) ist im Vergleich zu DMEM fast um das 1000-fache erhöht. Ariello *et al.* zeigten, dass die Behandlung von Neuroblastomazellen mit 50-300  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  über einen Zeitraum von 24 h neben dem Verlust der Plasmamembranintegrität vor allem die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt (Aricello *et al.*, 2005). In B-Medium liegt die Konzentration von  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  zwar lediglich bei etwa 3  $\mu\text{M}$ , es könnte jedoch durch die Ultrafiltration auch zur Konzentrierung der Kupferionen gekommen sein. Es wäre daher sinnvoll, für weiterführende Experimente dialysiertes Toxinkonzentrat zu verwenden, um die Salzkonzentration zu verringern. Da sich der starke toxische Effekt des Überstandes nicht alleine auf den niedrigen pH und eine hohe Salzkonzentration zurückführen lässt, muss noch ein weiterer Faktor eine Rolle spielen. Eine Erklärung wäre die Sekretion von *K. lactis*-Proteinen, die auf Säugerzellen wachstums-

hemmend wirken. Swaim *et al.* gelang es, 81 von *K. lactis* sezernierte Proteine zu identifizieren. Darunter befinden sich Proteine, die an Zellwandstruktur und Zellwandsynthese, am Kohlenstoffmetabolismus und an der Proteolyse beteiligt sind (Swaim *et al.*, 2008). Unter anderem könnten Proteasen im Kulturüberstand für die toxischen Effekte verantwortlich sein, indem sie die Membranproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen abbauen und so die Funktion der Plasmamembran zerstören. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden beide Toxinkonzentrate und die Kontrolle mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail behandelt, um eventuell vorhandene Proteasen zu inaktivieren. Bei dem toxinfreien Überstand zeigte sich in der Tat eine signifikante Reduktion der Toxizität. Bei dem Toxin hingegen war dieser Effekt nicht zu beobachten, obwohl das Vorhandensein von Proteasen auch hier zu erwarten gewesen wäre, da die Toxinkonzentrate unter denselben Kulturbedingungen und mit derselben Hefetransformante durchgeführt wurden. Vermutlich überlagert die Toxizität von K28 den Effekt der Proteasen, was bedeuten würde, dass die Toxizität des Toxinkonzentrates, wie zu erwarten, auf K28 und nicht auf die Wirkung von Proteasen zurückzuführen ist.

Die Toxizität des Kulturüberstandes beruht vermutlich auf einer Kombination aus saurem pH, Salzen und von *K. lactis* sezernierten Proteasen. Obwohl es starke Hinweise dafür gibt, dass K28 die DNA-Synthese verschiedener Säugerzelllinien zu inhibieren scheint, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Toxizität nicht auf K28 alleine zurückzuführen ist, sondern auch aus den gewählten Inkubationsbedingungen und der Zusammensetzung des Konzentrates resultiert. Für zukünftige Experimente wäre es daher sinnvoll, das Konzentrat zunächst zu dialysieren, um die Salzkonzentration zu verringern und mit Proteaseinhibitoren zu behandeln. Es wäre zudem von Vorteil stärker konzentriertes und reineres Toxin zu verwenden, um das zum Medium zugegebene Volumen zu verringern, so dass der pH weniger stark gesenkt wird. Am sinnvollsten wäre es, den pH der Inkubationslösung auf 5,8 einzustellen, da K28 noch aktiv ist und die Zellen weniger beeinträchtigt werden.

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war der Nachweis einer Toxinbindung oder –internalisierung. HeLa-Zellen wurden analog zum Toxizitäts-Assay behandelt und unmittelbar nach der Toxinbehandlung fixiert, permeabilisiert und mit anti-K28-Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper kam ein Cy2-gekoppelter anti-„Rabbit“-Antikörper zum Einsatz. Die Zellen wurden mit DRAQ5<sup>TM</sup>, einem DNA-bindenden Farbstoff, und Phalloidin gegengefärbt. Letzteres diente der Visualisierung des Aktincytoskeletts. Nach 20-minütiger Toxinbehandlung konnten weder Veränderungen der Zellmorphologie noch apoptotische Merkmale festgestellt werden. Toxinbehandelte Zellen zeigten kleine punktförmige Strukturen, die über das gesamte Cytoplasma verteilt waren. In vereinzelt Zellen schienen diese Punkte vermehrt im Bereich um den Zellkern lokalisiert zu sein, was mittels „Z-stack“ bestätigt werden konnte. Außerhalb der Zellen bildeten sich größere Antikörper-Toxin-Aggregate, die trotz mehrerer Waschschriffe nicht entfernt werden konnten. Bei dem eingesetzten anti-K28-Antikörper handelte es sich um unbehandeltes Antikörperserum. Aufgrund dessen konnten auch in einigen Kontrollen, beispielsweise nach Inkubation mit Hebes-Medium, ähnliche Strukturen in der Zelle beobachtet werden, auch wenn hier keine verstärkte Verteilung um den Zellkern erkennbar war. Folglich war der eingesetzte Antikörper für indirekte Immunfluoreszenz nicht geeignet und es konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob K28 von Säugerzellen internalisiert wird. Für spätere Experimente ist es unabdingbar, das verwendete Antikörperserum zu reinigen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Bislang konnte aufgrund ungeeigneter Kontrollen weder eine Toxinbindung oder –aufnahme, noch eine toxische Wirkung von K28 auf Säugerzellen eindeutig nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass das Toxin seinen intrazellulären Zielort womöglich nicht erreicht, da entweder die Zellbindung oder der retrograde Transport nicht oder nur unzureichend erfolgen, wurden Toxinkonzentrat und entsprechende Kontrolllösungen direkt in das Cytoplasma von HeLa und Hep-2 Zellen

injiziert. Die Mikroinjektion wurde von Dr. Sascha Pust durchgeführt. Obwohl auch in diesem Experiment einige Zellen nach Injektion von Kontrolllösungen abstarben, konnte ein vermehrtes Absterben K28-behandelter Zellen beobachtet werden. Generell korrelierte die Toxizität mit der Menge an injizierter Flüssigkeit, was sich leicht anhand des gleichzeitig injizierten Dextran-*TexRed* erkennen ließ. Wegen eines begrenzten Zeitrahmens konnten die Versuche nicht ausreichend reproduziert werden, um eine sichere Aussage treffen zu können. Unklar ist, ob das heterodimere Toxin nach Injektion ins Cytoplasma ohne die vorherige (teilweise) Entfaltung durch ER-luminale Chaperone, alleine aufgrund der reduzierenden Bedingungen des Cytosols in seine Untereinheiten dissoziiert und die  $\alpha$ -Untereinheit schließlich in ihrer aktiven Konformation vorliegt und in den Zellkern gelangen kann.

In dieser Arbeit wurde eine Toxinvariante eingesetzt, die ein KDEL- anstelle eines HDEL-Motivs trägt. Diese Modifikation beruhte auf Angaben früherer Publikationen, wonach das KDEL-Motiv bei ER-luminalen Säugerproteinen wesentlich häufiger vertreten ist (Wilson *et al.*, 1992). Neuere Publikationen sprechen jedoch von KDEL und HDEL als den häufigsten ER-Retentionssignalen im Menschen (Raykhel *et al.*, 2007). Durch systematische Analyse konnten Raykhel und Mitarbeiter unterschiedliche Spezifitäten der drei humanen KDEL-Rezeptoren nachweisen. Mit Hilfe von Interaktionsstudien beruhend auf dem BiFC-Assay wurden 27 verschiedene potenzielle Retentionssignale bezüglich ihrer Bindung an die einzelnen Rezeptoren untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass sowohl ERD21 als auch ERD23 HDEL mit höherer Affinität binden als KDEL. Das BiFC-Signal von ERD23-HDEL lag dabei sogar doppelt so hoch (Raykhel *et al.*, 2007). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Peptide, die ein C-terminales HDEL-Motiv besitzen *in vivo* sehr effizient an Säugerzellen binden. Damals wurde jedoch spekuliert, dass eine weniger starke Bindung an den KDEL-Rezeptor die Freisetzung der Proteine im ER begünstigt (Wilson *et al.*, 1992). Dennoch wäre eine Alternative, die Wirkung des natürlichen Toxins mit HDEL-Motiv auf Säugerzellen zu untersuchen.

## V Zusammenfassung

In diesem Teil der Studie wurde die Toxinwirkung von K28 auf Säugerzellen untersucht. Um die Toxinaufnahme in Säugerzellen zu erleichtern, wurde ein heterolog in *K. lactis* exprimiertes Toxin verwendet, welches anstelle eines C-terminalen HDEL-Motivs das in Säugern gängigere Sortiersignal KDEL besaß.

Da K28 sensitive Hefen durch schnelle Inhibierung der DNA-Synthese abtötet, wurde die Toxizität von K28 auf humane Zelllinien mittels DNA-Synthese-Messung bestimmt. Bei allen getesteten Zelllinien zeigte sich eine starke Hemmung der DNA-Synthese, wobei Hep-2 und HeLa-Zellen die größte Sensitivität zeigten. Der toxische Effekt konnte mikroskopisch bestätigt werden.

Unglücklicherweise bewirkte der toxinfreie *K. lactis* Kulturüberstand, der als Negativkontrolle diente, ebenfalls eine Hemmung der DNA-Synthese. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Effekt des Überstandes auf den niedrigen pH-Wert, eine hohe Salzkonzentration und insbesondere auf von *K. lactis* sezernierte Proteasen zurückzuführen war, wohingegen die Toxizität des Toxinkonzentrates fast ausschließlich auf der Toxinwirkung selbst und weniger auf der Aktivität von Proteasen beruhte.

Durch Mikroinjektion von K28 in das Cytoplasma von Hep-2/HeLa Zellen konnte das Ergebnis der DNA-Synthese-Messung bestätigt werden, wonach das Toxin Hep-2/HeLa Zellen effektiver abtötet als der injizierte Kulturüberstand.

Eine Toxinbindung oder –internalisierung konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nicht nachgewiesen werden, da die verwendeten Antikörper zu geringe Spezifität aufwiesen und falsch positive Signale lieferten. In einzelnen K28-behandelten Zellen zeigte sich jedoch eine Toxinakkumulation um den Zellkern.

## **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, April, 2009

(Mareike Kelkel)

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred J. Schmitt für dieses interessante und herausfordernde Thema. Durch sein stetes Interesse am Fortschritt dieser Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und aufmunternden Worte hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken und dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, mich als Stipendiatin des Graduiertenkollegs weiterzuentwickeln.

Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferates und für die freundliche und hilfsbereite Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Dem Graduiertenkolleg der Deutschen Forschungsgemeinschaft GRK845 danke ich an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung, insbesondere für die Gelegenheit, sechs Wochen im Ausland zu forschen und an hochinteressanten Tagungen teilzunehmen. Frau Dr. Gabriele Amoroso möchte ich für die tolle Organisation der alljährlichen Symposien sowie der begleitenden Rahmenprogramme danken und dafür, dass sie stets eine gute Ansprechpartnerin für bürokratische und andere Fragen war.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schmitt sowie allen F-Praktikanten und Hiwis danke ich für eine unvergessliche, kurzweilige Zeit im Labor. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Frank Breinig und Dr. Frank Powilleit für zahlreiche methodische Ratschläge, bei Marc Lind für seine Hilfe bei gerätetechnischen Problemen und insbesondere bei Roswitha Schepp. Ihrem unermüdlichen, kompetenten Einsatz und unzähligen Überstunden verdanke ich, dass ich in Oslo ausreichend Toxinkonzentrat zur Verfügung hatte.

Ein großes Dankeschön geht an alle ehemaligen und derzeitigen Diplomanden, die mit großem Interesse und Arbeitseifer ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Nico Schäuble, der durch seine witzige und liebenswerte Art den Laboralltag aufgefrischt hat und immer mit Spaß bei der Arbeit war. Durch seinen Einsatz hat er großartige Ergebnisse geliefert. Stefan Schorr danke ich für seine enorme Begeisterung an der Wissenschaft, für zahlreiche gute Ideen und seine stete Gelassenheit – und nicht zuletzt für sein Verständnis, wenn ich mal wieder gestresst war.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei den „Mädels“ Julia Dausend, Meike Gratz, Tina Schnöder und Barbara Walch bedanken. Ich danke Euch für eine wunderbare Zeit mit unzähligen witzigen, erfrischenden Momenten, die meinen Laboralltag aufgepeppt haben, an die nötigen Kaffeepausen, Euer offenes Ohr und Eure Aufmunterungen und nicht zu vergessen die vielen schönen gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors: die Weihnachtsmarktbesuche, die Dienstagabende im Hemmingways, die delikatsten Menüs, die jede von Euch gezaubert hat, Eure kompetente Beratung bei der Auswahl der Hochzeitsgarderobe und natürlich Euren Besuch in Oslo. Während unserer gemeinsamen Laborzeit sind wir richtig gute Freundinnen geworden; ich danke Euch für eine wundervolle Zeit! Ohne Euch fehlt ein Stück von mir - ich werde Euch wirklich vermissen!

Julia danke ich dafür, dass ich sie immer mit fachlichen Fragen löchern konnte und sie sich, selbst wenn sie keine Antwort wusste, bemüht hat, im Internet Antworten zu finden (und natürlich für die Vorlage zu Abbildung 55). Bei Barbara möchte ich mich besonders für ihre liebenswerten, aufmunternden Worte bedanken, gerade in der Endphase dieser Arbeit, für ihre ständige Hilfsbereitschaft und natürlich für die Reitstunde mit dem liebsten Pferd der Welt. Tina, Dir danke ich von ganzem Herzen für Deine Fähigkeit zuzuhören und immer die richtigen Worte zu finden, dafür, dass Du drei Wochen mit mir und meinem Fotoapparat in Australien ausgehalten und mich auf meinem Weg durch Studium, Diplomarbeit und Promotion treu begleitet hast. Eine bessere Trauzeugin und Freundin hätte ich nicht finden können.

Prof. Dr. Kirsten Sandvig danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Krebsforschung in Oslo einen Teil dieser Arbeit durchführen zu dürfen. Ich danke ihr für das große Interesse an meinem Thema, für die fruchtbaren Diskussionen und dafür, dass sie mir kompetente Ansprechpartner zur Verfügung gestellt hat. Dr. Maria L. Torgersen und Dr. Sascha Pust danke ich für ihre hilfsbereite Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Säugerzell-Experimente. Prof. Dr. Sjur Olsnes danke ich für die netten kleinen Gespräche zwischendurch. Ein besonderer Dank geht zudem an meine dortige Mitbewohnerin Angela Oppelt, die mir durch viele gemeinsame Unternehmungen, ihre offene Art und ihre Begeisterung für Norwegen das Land und die Leute näher gebracht hat.

Der AG von Prof. Dr. Rolf Müller danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der 2D-Gele und der Massenspektrometrie. Insbesondere danke ich in diesem Zusammenhang Dr. Yasser Elnakady, Matthias Altmeyer und Jennifer Herrmann.

Jenny Piecuch und Tanja Mushak danke ich ganz herzlich für die schönen Tage in Oslo und die netten Gespräche sowie die Weinproben während der Grako-Treffen.

Allen Freunden, insbesondere Michael und Kathrin, danke ich für die vielen „Schwenk-Sessions“ und die lustigen Momente, die die nötige Ablenkung zum Laboralltag brachten.

Am Schluss möchte ich den wichtigsten Personen in meinem Leben danken, ohne die ich es nie soweit gebracht hätte: meinen Eltern und Geschwistern, die mich in allem unterstützt haben und stets gute Zuhörer waren. Meiner Schwester Melanie danke ich vor allem für ihre unermüdlichen Aufforderungen zu sportlichen Aktivitäten und die gemeinsamen Shoppingtouren.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Ehemann Christian Kelkel, der mich durch das gesamte Studium begleitet, meine Launen ertragen, mich ständig zum Lachen gebracht und nie den Glauben an mich verloren hat. Danke, dass es Dich gibt.

## Lebenslauf

Name: **Mareike Kelkel**, geb. Sehn  
Geburtsdatum: 31. Mai 1981  
Geburtsort: Saarbrücken  
Familienstand: verheiratet, keine Kinder

### Beruflicher Werdegang

seit Jan 2006 Stipendiatin des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport.“ (GRK 845) der Technischen Universität Kaiserslautern, der Uniklinik Homburg und der Universität des Saarlandes Saarbrücken.

Im Rahmen des Graduiertenkollegs durchgeführte Promotion am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes, bei Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

Thema der Dissertation:

„Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen  $\alpha$ -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe.“

Mai/Juni 2008 Ein Teil der Experimente dieser Dissertation wurde während eines sechswöchigen Auslandsaufenthaltes am Institut für Krebsforschung, Radium Hospital in Oslo (Norwegen) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kirsten Sandvig durchgeführt.

### Studium

Jan-Nov 2005 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie (Prof. Dr. M.J. Schmitt)  
Thema der Diplomarbeit:  
„Phäno- und genotypische Charakterisierung eines aus Wein isolierten Killerstammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.“

2000–2005 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes Saarbrücken  
Abschluss: Diplom Biologin mit Auszeichnung (1,1)  
Hauptfach: Molekulare Zellbiologie  
Nebenfächer: Virologie und Humangenetik

**Schulische Ausbildung**

1991 bis 2000 Marie-Luise-Kaschnitz-Gymnasium, Völklingen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (2,1)