

***In vivo* Topologie und Lokalisation des  
zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p und dessen  
Funktion bei der Endozytose des  
viralen K28-Toxins in Hefe**

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

**vorgelegt von**

Diplom-Biologin  
**Julia Dausend**

**Saarbrücken 2010**

Tag des Kolloquiums:	22.03.2011
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Stefan Diebels
Prüfungsausschuss:	
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Manfred J. Schmitt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Vorsitzender:	Prof. Dr. Elmar Heinzle
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. Gert-Wieland Kohring

**On ne fait jamais attention à ce qui a été fait;  
on ne voit que ce qui reste à faire.**

Marie Curie

Für meine Eltern,  
die mir stets im rechten Augenblick  
Wurzeln oder Flügel verleihen.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	.....
Abstract .....	.....
<b>I Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1. Der HDEL-Rezeptor Erd2p.....	1
1.1 Die intrazelluläre Verteilung von HDEL- und KDEL-Rezeptoren .....	3
1.2 Suppressoren der <i>erd2</i> -Deletion.....	4
1.3 Die Topologie von HDEL- und KDEL-Rezeptoren .....	5
2. Topologie-Analyse .....	6
3. Ubiquitinierung.....	10
3.1 Ubiquitinierung und Endozytose .....	11
4. Killertoxine .....	13
4.1 Das viral kodierte Proteintoxin K28 der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
4.1.1 Prozessierung und Sekretion von K28 durch den Toxin-Produzenten.....	15
4.1.2 Aufnahme von K28 in sensitiven Zielzellen .....	17
4.1.3 Wirkmechanismus von K28 .....	21
4.1.4 Immunität gegen K28 .....	22
5. Ziele und Fragestellung der Arbeit .....	24
<b>II Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
1. Organismen.....	25
1.1 Bakterienstämme .....	25
1.2 Hefestämme .....	25
2. Plasmide .....	26
2.1 Plasmidkarten .....	34
2.1.1 Plasmide zur Zwischenklonierung .....	34
2.1.2 Grundvektoren zur Konstruktion der Expressionsvektoren für <i>S. cerevisiae</i> .....	35
2.1.3 Expressionsvektoren: pJD.6-Derivate .....	37
2.1.4 Expressionsvektoren: pJD.5-Derivate.....	39
2.1.5 Expressionsvektoren: pJD.1-Derivate.....	41
3. Oligonukleotide .....	42

4. Kultivierung.....	45
4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	45
4.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	46
4.3 Dauerkulturen.....	47
5. Zellzahlbestimmung.....	47
5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	47
5.2 Bestimmung der Optischen Dichte.....	48
6. Transformationsmethoden.....	48
6.1 Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	48
6.2 Lithium-Acetat-Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	49
7. Methoden zur DNA-Isolierung.....	50
7.1 Alkalische Lyse.....	50
7.2 innuPREP Plasmid Mini Kit.....	51
7.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	52
7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	52
7.5 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit.....	53
8. Polymerasekettenreaktion.....	53
9. Agarosegelelektrophorese.....	55
10. DNA-Restriktion.....	56
11. DNA-Ligation.....	57
12. TOPO- und Acceptor-Klonierung von PCR-Amplifikaten.....	58
12.1 pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit.....	58
12.2 AccepTor™-Cloning.....	58
13. DNA-Sequenzierung.....	59
14. Zellaufschluss-Methoden.....	59
15. Proteinbiochemische Methoden.....	61
15.1 Proteinfällung mit Aceton.....	61
15.2 SDS-PAGE.....	61
15.3 Western-Analyse.....	64
15.4 Deglykosylierung mit EndoH.....	66
16. Fluoreszenzmikroskopische Methoden.....	67
16.1 Fluoreszenzfarbstoffe.....	68
16.2 Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	70
16.3 Ratiometrische Fluoreszenzmessungen.....	70
16.4 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	71

17. Wachstumstests .....	72
17.1 Agardiffusionstest .....	72
17.2 Wachstumsstudien mit dem „Ras recruitment system“ .....	72
18. Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien .....	73
<b>III Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
1. Nachweis der Kolokalisation des HDEL-Rezeptors Erd2p in der Plasmamembran von <i>S. cerevisiae</i> .....	75
1.1 Untersuchungen zur zellulären Verteilung von Erd2pGFP-Varianten in <i>S. cerevisiae</i> .....	76
1.1.1 Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Expression verschiedener Erd2pGFP-Fusionen .....	76
1.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Kolokalisationsstudien an GFP- markiertem Erd2p .....	84
1.1.3 Untersuchungen zur Lokalisation einer Erd2pGFP-Variante mit zusätzlichem Transportsignal.....	87
1.2 Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation von Erd2p durch das „RAS recruitment system“ .....	90
2. Topologie des HDEL-Rezeptors Erd2p .....	95
2.1 <i>In silico</i> Topologie Analyse der Erd2p-Sequenz .....	95
2.2 <i>In vivo</i> Topologie-Analyse von Erd2p .....	99
2.2.1 <i>In vivo</i> Topologie-Analyse von Erd2p über den Wachstums- reporter RAS.....	100
2.2.2 <i>In vivo</i> Topologie-Analyse von Erd2p über den Glykosylierungs- reporter SUC2AV5.....	103
2.2.3 <i>In vivo</i> Topologie-Analyse von Erd2p über ratiometrische Fluoreszenzmessung .....	107
3. Untersuchungen zur Funktion von Erd2p bei der Internalisierung des Toxins K28 .....	118
3.1 Sequenzanalyse von Erd2p auf mögliche Endozytosesignale.....	118
3.1.1 Identifikation von Ubiquitinierungsmotiven in Erd2p.....	119
3.1.2 <i>In silico</i> Analyse von Erd2p mit NetPhosK 1.0 .....	120
3.2 Untersuchungen zur Funktionalität von Erd2p-Varianten ohne Endozytosesignale.....	124
3.2.1 Stammkonstruktion zur funktionellen Untersuchung von Erd2p-Varianten.....	126
3.2.2 Einfluss verschiedener Erd2p-Varianten auf die K28-Sensitivität von <i>S. cerevisiae</i> .....	131
3.2.2.1 Einfluss des N-terminalen NPF-Signals von Erd2p .....	132
3.2.2.2 Einfluss des C-terminalen Lysin-Clusters und des potentiell phosphorylierten Threoninrests von Erd2p.....	133
3.2.2.3 Einfluss einer GFP-Markierung von Erd2p.....	136
3.2.2.4 Einfluss von Erd2p-Varianten mit zusätzlichen Transport- Signalen.....	136

4. Ubiquitinierung von Erd2p .....	139
4.1 Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Ubiquitinierung von Erd2p.....	139
4.2 Nachweis der Interaktion von Erd2p und Rsp5p mittels bimolekulare Fluoreszenzkomplementation .....	141
4.3 Nachweis der der der Beteiligung des Art-Adapter-Systems an der Toxizitätsvermittlung von K8 .....	148
<b>IV Diskussion .....</b>	<b>151</b>
Die Lokalisation des HDEL-Rezeptors Erd2p in <i>S. cerevisiae</i> .....	153
Die Topologie des HDEL-Rezeptors.....	167
Endozytose-Motive innerhalb der HDEL-Rezeptor-Sequenz .....	178
Vergleich der K28-Aufnahme mit der Endozytose anderer Toxine .....	190
Ausblick .....	199
<b>V Zusammenfassung .....</b>	<b>202</b>
<b>VI Literaturverzeichnis .....</b>	<b>206</b>
Erklärung .....	227
Danksagung .....	228
Lebenslauf .....	230

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CLSM	„confocal laser scanning microscope“
CT	Cholera-Toxin
C-Terminus	Carboxyterminus
d/o	„drop out“
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DT	Diphtherie-Toxin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLB	„gel loading buffer“
GTE	Glukose Tris EDTA
HRP	„horseradish peroxidase“
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani „broth“
LiAc	Lithiumacetat
LT	<i>E. coli</i> „heat labile toxin“
MCS	„multiple cloning site“
N-Terminus	Aminoternus

OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
PEx	Pseudomonas-Exotoxin A
PT	Pertussis-Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTA	Ricin-Untereinheit A
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLTx	„Shiga like toxin“
SOE	„splicing by overlapping extension“
STx	Shiga-Toxin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS	„Tris buffered saline“
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TeNT	Tetanus-Neurotoxin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„units“
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
WB	Western Blot
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
yEGFP	„yeast enhanced GFP“
YNB	„yeast nitrogen base“
YPD	„yeast extract peptone dextrose“
YPG	„yeast extract peptone galactose“

## Abstract

*Saccharomyces cerevisiae* strains infected with the M28 double-stranded RNA killer virus naturally secrete the heterodimeric killer toxin (K28) which is a member of the A/B toxin family. After a two-step entering process across the cell wall and the plasma membrane the toxin reaches the cytosol of a sensitive target cell by travelling the secretion pathway in reverse. The alpha-toxin inhibits DNA synthesis in the nucleus, leads to a cell cycle arrest and finally causes apoptotic cell death. The key component in the retrograde transport of K28 is the HDEL receptor Erd2p. Previous experiments indicated a function for Erd2p as secondary receptor of the toxin at the level of the plasma membrane.

This study concentrates on structural as well as functional details of Erd2p. Confocal fluorescence microscopy and a growth based reporter assay confirmed the colocalization of Erd2p in ER and Golgi compartments and in the plasma membrane. The topology of the HDEL receptor was elucidated by a combination of *in silico* topology prediction and the analysis of truncated receptor variants with three independent *in vivo* topology reporter systems. Mutational analysis revealed N- and C-terminal endocytic motifs of Erd2p relevant for the uptake of receptor toxin complexes. The corroboration of the Erd2p/Rsp5p interaction via BiFC and the identification of Art-proteins crucial for toxin sensitivity verified the ubiquitinylation of Erd2p signaling for the receptor mediated endocytotic uptake of K28.

*Saccharomyce cerevisiae* Stämme sekretieren bei einer Infektion mit dem M28 dsRNA Killervirus das heterodimere Killertoxin K28, ein Mitglied der A/B-Toxin-Familie. Nach einem zweistufigen Aufnahmeprozess über die Zellwand und die Plasmamembran erreicht das Toxin das Zytosol der sensitiven Zielzelle, indem es dem Sekretionsweg in entgegengesetzter Richtung folgt. Die  $\alpha$ -Untereinheit inhibiert im Kern die DNA-Synthese, löst einen Zellzyklusarrest aus und verursacht schließlich Apoptose. Die Schlüsselrolle im retrograden Transport von K28 nimmt der HDEL-Rezeptor Erd2p ein. Frühere Experimente deuteten auf eine Funktion von Erd2p als Sekundärrezeptor des Toxins auf Ebene der Plasmamembran hin.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Struktur und die Funktion von Erd2p. Über konfokale Fluoreszenzmikroskopie und wachstumsbasierte Reporterfusionen konnte die Erd2p-Kolokalisation in ER- und Golgi-Kompartimenten sowie der Plasmamembran bestätigt werden. Die Topologie des Rezeptors wurde über Kombination einer *in silico* Topologie-Vorhersage mit drei unabhängigen *in vivo* Topologie-Reportern aufgeklärt. Mutagenese-Studien deckten N- und C-terminale Motive in Erd2p auf, die an der Endozytose des Rezeptor/Toxin-Komplexes beteiligt sind. Die Bestätigung der Erd2p/Rsp5p-Interaktion über BiFC und die Identifizierung für die K28-Sensitivität notwendiger Art-Proteine belegen die Erd2p-Ubiquitinierung als Signalgebung zur rezeptorvermittelten Endozytose von K28.

## I Einleitung

### 1. Der HDEL-Rezeptor Erd2p

In eukaryotischen Zellen stellen Organellen membranumschlossene Reaktionsbereiche dar, in denen Stoffwechselprozesse ablaufen. Um die maximale Effizienz dieser Prozesse zu garantieren, muss eine spezifische Zusammensetzung der Kompartimente beibehalten werden. Ein Stoffaustausch kann durch den vesikulären Transport gewährleistet werden. Durch Sortiersignale wird die Spezifität der Transportsysteme festgelegt.

In Säugern tragen Proteine des luminalen ER an ihrem C-Terminus das Peptidsignal KDEL (Lysin – Aspartat – Glutamat – Leucin). Diese Sequenz wurde zunächst an dem ER-Chaperon BiP und der Proteindisulfidomerase identifiziert (Munro und Pelham, 1987). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* lautet die Sequenz HDEL (Pelham *et al.*, 1988). Über die Analyse zahlreicher Mutanten, die das ER-Protein BiP sekretieren, wurden die Gene *ERD1* und *ERD2* (ER retention defective) als essentielle Komponenten des Rückhaltesystems identifiziert. Ein *ERD1*-Defekt resultiert in veränderten Glykosylierungsmodifikationen von ER-Proteinen, nicht jedoch in strukturellen ER- oder Golgi-Defekten (Hardwick *et al.*, 1990).

Parallel zum Genprodukt von *ERD1* wurde auch Erd2p näher charakterisiert. Erste Hydrophathieblots zeigten mehrere potentielle Transmembranbereiche an und auch biochemisch konnte Erd2p in Membranfraktionen nachgewiesen werden. Die Lokalisation einer getaggten Variante ließ sich auf ein post-ER/Golgi-Kompartiment eingrenzen. Die Überexpression eines ER-Retentionssubstrats führt zu dessen Sekretion, was auf eine Sättigung des Rückhaltemechanismus schließen lässt. Eine *ERD2*-Überexpression jedoch erhöht die Kapazität des Retentionssystems und lieferte somit einen weiteren Hinweis, dass es sich bei Erd2p um den Rezeptor der HDEL-Fracht handelt. Neben Verlust der ER-Retention tritt in Zellen mit einer *erd2*-Mutation ein weiterer Defekt auf: Akkumulation innerer Membranen und Störungen im Sekretionsweg auf Ebene des Golgi-Apparats. Dieser Effekt wurde zunächst

für den fatalen Wachstumsdefekt verantwortlich gemacht, der in Zellen auftritt, sobald die Kopienzahl an Erd2p vermindert wird (Semenza *et al.*, 1990).

Townsley *et al.* (1994) zeigten schließlich, dass der Golgi-Defekt in *erd2*-Deletionsmutanten nur ein sekundärer Effekt ist. Die Notwendigkeit von *ERD2* liegt in der Rückführung ER-residenter Fracht begründet, ein bloßes Recycling des Rezeptors zum ER ist nicht ausreichend. Erstaunlich ist, dass bisher kein einzelnes essentielles ER-Protein identifiziert werden konnte, dessen mangelnde Retention zu dem beobachteten letalen Phänotyp führt. Hefe-Mutanten, deren essentielles ER-Chaperon Kar2p/BiP kein HDEL-Signal besitzt sind lebensfähig (Hardwick *et al.*, 1990), ebenso Stämme mit HDEL-freier Proteindisulfidisomerase (LaMantia *et al.*, 1991). Denkbar ist also, dass nicht der Verlust eines einzelnen ER-residenten Proteins ausschlaggebend ist, sondern sich erst der Verlust mehrerer dieser essentiellen HDEL-tragenden Proteine letal auswirkt (Townsley *et al.*, 1994).

Inzwischen sind Homologe zu Erd2p in zahlreichen Eukaryoten bekannt (Pflugler *et al.*, 2004); von Protozoen wie *Toxoplasma gondii* oder *Plasmodium falciparum*, über Pilze wie *Schizosaccharomyces pombe* oder *Klyveromyces lactis* bis hin zum Pflanzen- (*Arabidopsis thaliana*) und Tierreich (u.a. *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, und *Mus musculus*). Im humanen Proteom sind drei funktionell redundante Rezeptoren identifiziert, die in unterschiedlichem Maße KDEL- und HDEL-Signale erkennen (Raykhel *et al.*, 2007). Die exakten Signalsequenzen unterscheiden sich in den einzelnen Spezies häufig in der viertletzten Position des C-Terminus. So lautet das ER-Retentionssignal in *Schizosaccharomyces pombe* ADEL (Pidoux und Armstrong, 1992), in *Klyveromyces lactis* meist DDEL (Lewis *et al.*, 1990). Die hohe Spezifität des Rückhaltesystems zeigt sich auch an dem von Lewis und Pelham (1990) identifizierten humanen KDEL-Rezeptor. ERD2.1 kann den *erd2*-Phänotyp in *S. cerevisiae* nicht komplementieren und in Säugerzellen kann der Rezeptor aus der Hefe die Retentionsfunktion nicht gewährleisten. Auch das zweite *ERD2*-Homolog in Säugern, ERD2.2, erkennt in erster Linie das Signalmotiv KDEL, wenn auch eine schwache Reaktion auf DDEL-Fracht

nachzuweisen war (Lewis und Pelham, 1992a). Obschon KDEL und HDEL die häufigsten Retentionssignale darzustellen scheinen, sind auch zahlreiche Varianten des Signals wie RDEL, KEEL oder stark veränderte Formen wie NDELK in der Lage, die Rückführung in Säugern und Pflanzen zu ermöglichen (Vitale *et al.*, 1993).

1993 wurde erstmals ein Modell für den Rückhalte Mechanismus beschrieben, der auf einer pH-abhängigen KDEL-Bindung an den Rezeptor beruht (Wilson *et al.*, 1993). Der schwach saure pH-Wert in Golgi-Kompartimenten erlaubt die Bindung HDEL-tragender Proteine an den Rezeptor. Der Liganden/Rezeptor-Komplex wird über COP I-beschichtete Vesikel und tubuläre Strukturen zum ER rücktransportiert. Bei neutralem pH-Wert des ER (Mellman *et al.*, 1986) dissoziieren Rezeptor und Frachtmolekül. Die Fracht verbleibt im ER, während der Rezeptor über den klassischen Sekretionsweg zum Golgi-Apparat zurückkehrt und dort für einen erneuten Rücktransportprozess bereit steht.

### **1.1 Die intrazelluläre Verteilung von HDEL- und KDEL-Rezeptoren**

Der bovine KDEL-Rezeptor mERD2 (p23) zeigt in Säugerzellen eine Verteilung in kernnahen Golgi-Strukturen und in geringerem Ausmaß in punktuellen Strukturen, die sich über die ganze Zelle verteilen und dem ER-Golgi-Intermediärkompartiment und ER-Substrukturen zugeordnet werden können (Tang *et al.*, 1993). Auch PfERD2, das Rezeptor-Homolog aus *Plasmodium falciparum* mit 42%iger Identität zu Hefe und Säuger, zeigt punktförmige Strukturen in Kernnähe (Elmendorf und Haldar, 1993). Der Transport von Erd2p zwischen punktförmigen ER- und kernnahen Golgi-Strukturen in Abhängigkeit von Proteinen des GET-Komplexes wird von Schuldiner *et al.* (2005) als Reaktion auf den Wechsel zwischen Minimal- und Komplexmedien beschrieben. GET-Proteine, deren Funktionen noch nicht vollständig geklärt sind, sind vermutlich an der ATP-abhängigen Golgi-ER-Passage, nicht aber am anterograden Transport beteiligt und zeigen ähnliche Verteilungsmuster.

Die Expression von KDEL-Frachtmolekülen verschiebt die hERD2-Expression in Säugerzellen aus Golgi-Strukturen zum ER (Lewis und Pelham 1992). Die intrazelluläre Verteilung von Erd2p und seinen Homologen ist also sehr

variabel und reagiert auf das Angebot an Liganden, um die korrekte Lokalisation ER-residenter Proteine zu garantieren.

## 1.2 Suppressoren der *erd2*-Deletion

Hardwick *et al.* (1992) beschrieben erstmals *SED*-Gene („suppressor of e*rd2* deletion“), die den  $\Delta$ *erd2*-Wachstumsdefekt komplementieren können. Bei Überexpression dieser Gene wird dennoch HDEL-Cargo sekretiert. Es wird also nur der Wachstumsdefekt aufgehoben. Zellen ohne Erd2p zeigen Defekte im anterograden Transport der Carboxypeptidase (CPY) zwischen Golgi und Vakuole oder zusätzlich bereits zwischen ER und Golgi. Morphologisch ist erkennbar, dass der Sekretionsweg gestört ist. Es wird ein „geschwollener“ Golgi-Apparat beschrieben, ER und Golgi sind dennoch deutlich voneinander getrennt. Dieser Phänotyp lässt sich folgendermaßen erklären: Erd2p als Komponente der Recycling-Vesikel kontrolliert indirekt auch die Rückführung von Membranen vom Golgi zum ER. Wenn der Erd2p-Rücktransport ausfällt, verbleiben andere Membranbestandteile wie Proteine und Lipide im Golgi-Membransystem integriert. Der ER-Vorwärtstransport erfolgt weiterhin, der Golgi wird jedoch durch Akkumulation von ER-Komponenten „vergiftet“, so dass der weitere Sekretionsweg stark gestört ist. Erd2p könnte also als Regulator für Golgi-Zusammensetzung und -Größe gesehen werden, eventuell in Form einer strukturellen Komponente der Carrier-Vesikel. Inhibiert man den anterograden ER-Golgi-Transport, kann der *erd2*-Wachstumsdefekt aufgehoben werden. *SED1* ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, das in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommt. Dieser Überfluss an Sed1p kann möglicherweise das Budding von Golgi-Vesikeln stimulieren und so das „Aufblähen“ des Golgi verhindern. Eine Überexpression der Dolicholphosphat-Mannose-Synthase *SED3/DPM1* (Orlean, 1990) schränkt den ER-Golgi-Transport nicht ein, führt aber zum Akkumulieren kleiner Vesikel. Eine mögliche Erklärung wäre die Veränderung der Fluidität und Fusionseigenschaften der Golgi-Membran entweder auf strukturelle Art und Weise oder durch die Veränderung des Stoffwechselgeschehens innerhalb des Golgi. So werden eventuell mehr Vesikel vom Golgi abgeschnürt, was dieses

Kompartiment funktionell stabilisiert. *SED2/SEC12* und *SED4* zeigten die stärksten Auswirkungen auf den  $\Delta$ *erd2*-Phänotyp. *SEC12* behindert den ER-Golgi-Vorwärtstransport und könnte damit den Golgi stabilisieren (Kaiser und Schekman, 1990; Rexach und Schekman, 1991). Die N-Termini von Sed4p und Sec12p sind zu 45 % identisch und könnten ähnliche Funktionen haben. Für Sed4p wird zusätzlich ein Kreislauf zwischen ER und Golgi vermutet, der selbst einen Einfluss auf den Golgi-ER-Rücktransport haben könnte (Hardwick *et al.*, 1992).

Es werden auch andere Kompensationswege etwa über die ERAD-Komponente *IRE1* beschrieben (Beh und Rose, 1995). Folglich wird bei fehlender Retention von ER-Chaperonen ER-Stress induziert, der über Ire1p die Transkription dieser Faltungshelfer hochreguliert.

### **1.3 Die Topologie von HDEL- und KDEL-Rezeptoren**

Die *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors der Hefe *S. cerevisiae* ist bisher noch unbekannt. Zur dreidimensionalen Struktur des bovinen Erd2p-Homologs gibt es zwei divergierende Modelle. Townsley *et al.* (1993) postulierten aufgrund einer Hydropathie-Analyse eine Struktur mit sieben Transmembraneinheiten, wonach der C-Terminus zytosolisch orientiert vorliegt, der N-Terminus luminal. Das von Sing *et al.* (1993) erstellte Topologie-Modell geht von sechs hydrophoben Einheiten aus, welche die Membran vollständig durchspannen und einem hydrophoben Bereich, der aufgrund seiner geringen Länge keine Transmembrandomäne formt. Dieses Modell basiert entgegen den Analysen von Townsley nicht nur auf einer reinen *in silico* Sequenzanalyse auf Hydrophobizität, sondern gründet sich auf ein Glykosylierungsreportersystem. Es wurden Varianten des Rezeptors hergestellt, in denen eine Gykosylierungsreporter-Domäne in einen der „loop“-Bereiche zwischen zwei potentiellen Transmembraneinheiten eingefügt wurde. Nach Translation in Mikrosomen konnten anhand einer Massenzunahme diejenigen Varianten identifiziert werden, deren markierte „loop“-Struktur luminal orientiert vorliegt und entsprechende Glykosylierungsmodifikationen erhalten konnte. Die Lokalisation der beiden

Termini wurde durch „Tagging“ und immunzytochemische Analyse als zytosolisch bestimmt.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Brach *et al.* (2009) bei der *in vivo* Topologie-Analyse des *ERD2*-Homologs in *Arabidopsis thaliana*. Bei diesen Analysen wurde ein redoxsensitives Fluoreszenzsystem an sukzessiv verkürzte Varianten des Rezeptors angefügt, das Aufschluss über die Orientierung der jeweiligen C-Termini im ER-Lumen bzw. im Zytosol gibt. Der Rezeptor *AtERD2* besitzt demnach sechs Transmembrandomänen, seine beiden Termini liegen zytosolisch vor.

## 2. Topologie-Analyse

Das Auffinden von Interaktions- und Regulationsdomänen in Membranproteinen setzt voraus, dass bekannt ist, welche Teilbereiche des Proteins auf zytosolischer oder nicht-zytosolischer Seite der Membran vorliegen. Die Topologie eines integralen Membranproteins gibt Auskunft über die Sequenzbereiche, welche die Membran durchspannen und über die zytoplasmatische oder nicht-zytoplasmatische Orientierung der verbindenden „loop“-Strukturen. Bitopische Membranproteine verfügen über eine einzelne Transmembraneinheit und werden nach ihrer Orientierung in zwei Kategorien unterteilt. Membranproteine vom Typ I besitzen einen zytoplasmatischen C-Terminus und einen ER-luminalen N-Terminus. Die Orientierung bei Typ II ist entgegengesetzt. Polytopische Membranproteine durchspannen die Membran mehrfach.

Algorithmen zur Vorhersage der Topologie von Membranproteinen anhand ihrer Primärstruktur basieren sich auf den bisherigen Kenntnissen über die Aminosäure-Verteilung in Transmembrandomänen. Diese bestehen aus  $\alpha$ -helikalen oder  $\beta$ -„barrel“-Strukturen. Auch wenn inzwischen Algorithmen die Vorhersage von membrangängigen Elementen in  $\beta$ -„barrel“-Membranproteinen ermöglichen (Gromiha *et al.*, 2008), ist die Identifizierung von Transmembran- $\alpha$ -Helices durch die zahlreichen frei zugänglichen Programme fundierter. Während membrandurchspannende  $\beta$ -„barrels“ neben hydrophoben auch polare und geladene Aminosäuren enthalten,

setzen sich  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren zusammen. Diese Tatsache wurde von den ersten Vorhersage-Algorithmen genutzt, welche allen Aminosäuren der Proteinsequenz ihre Hydrophobizität zuordneten und Bereiche, in denen viele hydrophobe Reste aufeinander folgen, als Transmembransegmente festlegten (Kyte und Doolittle, 1982). Andere Algorithmen wie die „dense alignment surface“-Methode integrieren Informationen über die Zusammensetzung der Transmembran-Helices bekannter Proteine in die Vorhersage. Potentielle Transmembransegmente werden durch eine hohe Sequenzhomologie zu bereits charakterisierten Transmembran-Helices eines Datensets festgelegt (Cserzo *et al.*, 1997). Nicht die exakte Übereinstimmung der Sequenzfolge, sondern die für einzelne Substrukturen von Membranproteinen charakteristische Verteilung von Aminosäuren bildet die Grundlage von Programmen, die mit dem „hidden Markov model“ arbeiten. Solche Algorithmen beurteilen die Zusammensetzungen der Helix-Kernstruktur, des Grenzbereichs zwischen Transmembransegment und „loop“, sowie der zytosolischen und luminalen Bereiche. Das sogenannte „training“ der Programme erfolgt an Datensets bekannter polytopischer Membranproteine (Tusnády und Simon, 1998). Anhand hochauflösender Strukturen von Membranproteinen wurde ermittelt, in welcher Häufigkeit die einzelnen Aminosäuren in bestimmten Substrukturen vorkommen (Ulmschneider *et al.*, 2005). Während die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Valin und Leucin in der Kernregion der  $\alpha$ -Helix dominieren, kommen kleine Reste wie Glycin oder Alanin ebenso wie Serin meist in Grenzbereichen vor. Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan herrschen an der Lipid/Wasser-Grenzfläche vor. Geladene Aminosäuren zeigen eine asymmetrische Verteilung in hydrophilen, nicht-membrangängigen Segmenten; besonders Arginin und Lysin finden sich vorrangig auf der zytosolischen Seite. Diese ladungsspezifische Anordnung spiegelt sich in der „positive inside rule“ wider und wurde inzwischen nicht nur in Prokaryoten, sondern auch in eukaryotischen Systemen bestätigt (von Heijne, 1992; Goder *et al.*, 2004).

Die *in silico* Analyse von polytopischen Membranproteinen sieht sich immer noch mit zahlreichen Herausforderungen konfrontiert. Speziell die Sonderfälle von dualer, multipler oder dynamischer Topologie entziehen sich der Analyse durch Vorhersage-Algorithmen (von Heijne, 2006). Auch unter der Voraussetzung einer stabilen, unveränderlichen Einlagerung von  $\alpha$ -Helices in die Membran ist die Festlegung der exakten Grenzen der Transmembraneinheiten schwierig. Die Zahl der experimentell untermauerten Topologie-Modelle ist immer noch gering, so dass die Datensets, auf denen Vorhersage-Programme aufbauen, in ihrem Umfang und im Organismen-Spektrum stark eingeschränkt sind. In Folge dessen differieren die *in silico* vorhergesagte und die tatsächliche *in vivo* Topologie häufig stark (Ott und Lingappa, 2002).

Es ist daher unerlässlich, ein *in silico* erstelltes Modell durch *in vivo* Analysen experimentell zu bestätigen, um eine valide Aussage zur Topologie eines Membranproteins treffen zu können. Solche *in vivo* Topologie-Analysen stützen sich auf Genfusions-Experimente mit Reportersystemen, die im Anschluss an die potentiellen Transmembransegmente angefügt werden. Als Reporter bieten sich Proteine an, deren katalytische Funktion nur auf einer Membranseite gewährleistet ist. In *E. coli* kann die alkalische Phosphatase (PhoA) Aufschluss über die periplasmatische Orientierung geben, da nur dort die korrekte Faltung des Reporters erfolgen kann (Manoil und Beckwith, 1986). Einen weiteren periplasmatischen Reporter stellt die  $\beta$ -Lactamase dar, welche eine Ampicillin-Resistenz vermittelt (Broome-Smith *et al.*, 1990). Eine Positionierung des C-Terminus auf der gegenüberliegenden zytoplasmatischen Membranseite kann über die Aktivität der angefügten  $\beta$ -Galaktosidase (Froshauer *et al.*, 1988) nachgewiesen werden. Statt die Enzym-Aktivität zu bestimmen, können in einem direkteren und weniger aufwändigen Testsystem GFP-Fusionen über die Fluoreszenzintensität ausgewertet werden. Nur bei zytoplasmatischer Orientierung des Fluoreszezeins können Faltung und Reifung des Fluorophors stattfinden. Mit einer Kombination aus PhoA und GFP nutzten Drew *et al.* (2002) ein

duales System zur *in vivo* Topologie-Kartierung von zwölf Proteinen der inneren Membran von *E. coli*.

Die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von Reporter-Proteinen wurde auch in *S. cerevisiae* als erste Strategie zur *in vivo* Topologie-Analyse benutzt. Bereits 1990 konnte die Orientierung von Transmembranhelices in zwei Hefe-Isozymen über Fusionsproteine in Wachstumstests bestimmt werden. Als Reporter wurde die katalytische Domäne von His4p benutzt, welche den letzten Schritt der Histidin-Biosynthese im Zytoplasma katalysiert (Sengstag *et al.*, 1990). Die *in vivo* Topologie von Gap1p (general amino acid permease), einem integralen Membranprotein mit zwölf Transmembraneinheiten, wurde über ein Glykosylierungsreportersystem aufgeklärt (Gilstring und Ljungdahl, 2000). Dieses System liefert den Nachweis auf der ER-luminalen Membranseite über eine Größenzunahme des Fusionsproteins durch das posttranslationale Anfügen von Zuckerresten. Über ein duales System aus Glykosylierungs- und Wachstumsreporter konnten Kim *et al.* (2003) die Lokalisation der C-Termini von 37 Proteinen in *S. cerevisiae* bestimmen. Eine im Zuge des Maßschneiderns von Fluoreszenzproteinen erzeugte GFP-Variante lieferte kürzlich ein neues Werkzeug zur *in vivo* Topologie-Analyse. Hanson *et al.* (2004) entwickelten redoxensitive GFP-Varianten mit veränderlichen Fluoreszenzeigenschaften. Bei redoxsensitivem GFP variieren die Anregungsmaxima zwischen reduzierenden Bedingungen im Zytoplasma und oxidierenden Bedingungen im ER-Lumen. So konnte die Membrantopologie von AtErd2 mit einem einzigen Reporter bestimmt werden, der auf beiden Membranseiten Signale lieferte (Brach *et al.*, 2008). Es ist zu erwarten, dass sich in den kommenden Jahren bioinformatische Werkzeuge zur *in silico* Vorhersage und experimentelle Herangehensweisen zusammen mit den wachsenden Kenntnissen der Transmembran-Erkennung durch Translokon-Komplexe ergänzen und folglich die Bestimmung der Topologie von integralen Membranproteinen stetig verlässlicher wird.

### 3. Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung ist eine reversible posttranslationale Proteinmodifikation, bei der Ubiquitin – ein kleines, hochkonserviertes Protein von 76 AS – an das Zielprotein angefügt wird (Hershko und Ciechanover, 1998). Gewöhnlich erfolgt die Verknüpfung über eine Isopeptid-Bindung an einen Lysinrest, jedoch können auch der N-Terminus oder Nicht-Lysin-Reste wie Cysteine den Angriffspunkt für die Ubiquitinierung darstellen (Ciechanover, 2005; Cadwell und Coscoy, 2005).

Die Ubiquitinierung benötigt drei aufeinanderfolgende Schritte, die jeweils von einem zentralen Enzym katalysiert werden. Unter ATP-Verbrauch wird Ubiquitin über eine Thioesterbindung an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) gebunden. Nach der Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf ein E2-Enzym wird es schließlich durch die Aktivität einer Ubiquitin-Ligase (E3) kovalent mit dem Zielprotein verknüpft (Kerscher *et al.*, 2006). Bisher ist bekannt, dass das Hefe-Genom ein E1, elf E2s und 54 E3s kodiert (Lauwers *et al.*, 2010).

Ubiquitin selbst besitzt sieben Lysinreste, die ebenfalls Ziele für weitere Ubiquitinierungsschritte bieten können. Bei kürzeren Ketten spricht man von einer Oligoubiquitinierung, mehr als vier Ubiquitin-Einheiten bilden eine Polyubiquitinkette aus. Das zelluläre Schicksal wird durch die Länge der Ketten ebenso wie durch die Topologie dieser Ketten bestimmt. Letztere wird durch die Wahl des Ubiquitin-eigenen Lysinrests als Ansatzpunkt weiterer Ubiquitin-Elemente festgelegt. Die Polyubiquitinierung der Ubiquitin-Einheiten über Lysin 48 kennzeichnet Proteine, die dem Proteasom zugeführt und abgebaut werden (Hershko und Ciechanover, 1992). Liegt eine Verknüpfung über Lysin 63 vor, signalisiert die Kette für einen Transport von der Plasmamembran zu Lysosomen (Barriere *et al.*, 2007). Die Monoubiquitinierung reguliert die Transkription im Rahmen einer Histon-Modifikation und spielt eine entscheidende Rolle bei der eukaryotischen DNA-Reparatur (Henry *et al.*, 2003; Muratani und Tansey, 2003; Garcia-Higuera *et al.*, 2001).

Die Bedeutung des Ubiquitinierungssystems zeigt sich an zahlreichen Krankheitsbildern, die in einem Verlust der Ubiquitin-Signale begründet sind; z.B. bei neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson, bei verschiedenen Tumoren, bei Kardio-vaskulären Erkrankungen wie dem Liddle-Syndrom und beim 3 M Syndrom, einer Wachstumsstörung (Shimura *et al.*, 2000; Scheffner und Staub, 2007; Huber *et al.*, 2005). Ein Genprodukt des Karposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus wurde als erstes Genprodukt identifiziert, das über Induktion der Ubiquitinierung die MHC I-abhängige Immunabwehr stilllegt (Hewitt *et al.*, 2002).

Über die Beeinflussung der Stabilität oder der Lokalisation einzelner Proteine nimmt die Ubiquitinierung eine essentielle Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen ein. Die Signalwirkung der Ubiquitinierung zum proteasomalen Abbau fehlgefalteter Proteine wurde anhand des Zusammenspiels zytoplasmatischer Chaperone und des Ubiquitin/Proteasom-Systems erkannt (Esser *et al.*, 2004). Intrazelluläre Signalwege wie der NFκB-Weg werden durch nichtproteolytische Polyubiquitin-Ketten reguliert (Kanayama *et al.*, 2004). Ubiquitinierung stellt auch einen wichtigen Regulationsmechanismus im Zellzyklus dar, wobei Zykline zyklisch ubiquitiniert und abgebaut werden (Bassermann *et al.*, 2005). Die Beteiligung der Ubiquitinierung an endozytotischen Prozessen wird im Folgenden näher erläutert.

### **3.1 Ubiquitinierung und Endozytose**

Transmembranproteine stellen in allen Organismen, vom Einzeller bis hin zu Säugern, die Selektivität des Transports über die Plasmamembran und die inneren Membransysteme sicher. Diese Transportprozesse müssen einer strikten Regulation unterliegen, um die Anpassung an veränderliche Umweltbedingungen zu garantieren. Besonders gut untersucht ist die Regulation von Plasmamembran-Transportern und -Rezeptoren in *Saccharomyces cerevisiae*. So ist beschrieben, dass Permeasen für bestimmte Nährstoffe von der Plasmamembran internalisiert werden, sobald ein Substrat-Überschuss vorliegt. Das Signal für die Internalisierung liefert eine Ubiquitinierung (Lauwers *et al.*, 2010). Den ersten Hinweis auf einen

Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und Transportereignissen lieferten Kölling und Hollenberg (1994). Sie beobachteten, dass in MAT a-Hefen mit Endozytosedefekten der Pheromontransporter Ste6p in einer ubiquitinierten Form an der Plasmamembran akkumuliert. Inzwischen ist bekannt, dass die Ubiquitinierung das Recycling von Ste6p zurück zur Plasmamembran reguliert (Krsmanovic *et al.*, 2005). Die ligandeninduzierte Aufnahme des G-Protein gekoppelten  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste2p setzt eine Ubiquitinierung an einem einzigen Lysinrest im C-Terminus voraus. Die Internalisierung folgt einem geregelten Ablauf, wonach infolge der Ligandenbindung eine Hyperphosphorylierung stattfindet, welche wiederum die Ubiquitinierung induziert (Hicke und Riezman, 1996; Hicke *et al.*, 1998). Die Ubiquitin-Ligase Rsp5p wurde als essentielle Komponente des Ubiquitin-abhängigen Prozesses identifiziert, der die Permeasen Gap1p und Fur4p herunterreguliert. Die PEST-ähnliche Sequenz im Pheromonrezeptor Ste3p enthält drei redundante Lysinreste und steuert die Ubiquitinierung, Endozytose und den Abbau des Rezeptors (Roth und Davis, 2000).

Die beiden Rezeptoren PDGFR („platelet derived growth factor receptor“) und EGFR („epidermal growth factor receptor“) sind die ersten beiden Rezeptoren in Säugern, bei denen eine Ubiquitinierung festgestellt wurde (Galcheva-Gargova *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1993). Inzwischen ist für die Mitglieder aus mindestens sechs Subfamilien von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) eine Liganden-abhängige Ubiquitinierung beschrieben (Miranda und Sorkin, 2007). An den beiden RTKs EGFR und HGFR/c-Met („hepatocyte growth factor receptor“) wurde die Ubiquitin-abhängige Internalisierung als negativer feedback-Mechanismus des Rezeptor-Signalwegs näher beschrieben. Zunächst aktiviert die Bindung des Liganden die RTK, so dass spezifische Tyrosine phosphoryliert werden. Diese modifizierten Reste der RTKs dienen im Folgenden als Bindungsmotiv für die Tyrosinkinase-Bindedomäne (TKB) der E3-Ubiquitin-Ligase. Nach der Ubiquitinierung der Rezeptoren erfolgt ihre Internalisierung (Sorkin und von Zastrow, 2002). Schwächer ubiquitinierte EGFR-Varianten, welche nicht effizient degradiert werden, bestätigten, dass die korrekte Ubiquitinierung für die lysosomale Zielsteuerung notwendig ist.

Bei einem reduzierten Ubiquitinierungsmuster tritt der Rezeptor in einen Recycling-Prozess zur Plasmamembran ein (Levkowitz *et al.*, 1999). Tubuläre Membranstrukturen sogenannter „multi vesicular bodies“ (MVBs) sind die zellulären Substrukturen, die für dieses Recycling verantwortlich sind.

#### **4. Killertoxine**

Das Killerphänomen in *Saccharomyces cerevisiae* wurde erstmalig in den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts beschrieben. Bevan und Makower untersuchten die antibiotische Wirkung eines sekretierten Proteintoxins, das andere Stämme derselben und auch verwandter Gattungen abtötet (Bevan und Makower, 1963). Inzwischen sind Killersysteme in den gut untersuchten Hefen *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* und zahlreichen anderen Gattungen identifiziert (Yokomori *et al.* 1988; Schmitt *et al.*, 1997; Stark *et al.*, 1990; Bolen *et al.*, 1994; Koltin und Day, 1975; Ashida *et al.*, 1983; Radler *et al.*, 1993; Marquina *et al.*, 2002).

Die Produktion eines Killertoxins bedeutet für Hefezellen einen zusätzlichen Energieaufwand und so lässt sich die Existenz von Killerstämmen in natürlicher Umgebung nur durch einen Selektionsvorteil erklären. In Ökosystemen kommt Hefen eine essentielle Rolle bei Abbauprozessen zu. An natürlichen Hefemischkulturen auf Früchten konnten Starmer und Mitarbeiter zeigen, dass der Toxinproduzent *Pichia kluyveri* die Verbreitung der sensitiven Hefe *Cryptococcus cereanus* einschränkt und damit einen entscheidenden Wachstumsvorteil erzielt (Starmer *et al.*, 1987). Die evolutionäre Bedeutung von Killerstämmen wirkt sich auch auf industrielle Prozesse aus. Bei der traditionellen Weinherstellung durch spontane Fermentation sind zum überwiegenden Teil Killerstämme beteiligt. Bei Kenntnis der endogenen Stämme kann eine gezielte Auswahl von konkurrenzfähigen Starterkulturen sowohl Produktionsleistung als auch -qualität verbessern (Vagnoli *et al.*, 1993; Magliani *et al.*, 1997). Die medizinische Anwendung von Killertoxinen als Alternativen zu klassischen Antimykotika wurde bereits am Beispiel von *Pneumocystis carinii*, dem Erreger von Pneumonien, vorgeschlagen (Cailliez *et*

*al.*, 1994). Auch erste Studien zum Einsatz von viral kodierten Killertoxinen zur Fungizid-Produktion in Kulturpflanzen zeigen eine neue Strategie zur Kontrolle von Pathogenen auf (Park *et al.*, 1996). Vielversprechend ist das Expressionssystem der viral kodierten Toxine in Hefen aus biotechnologischer Sicht. Sekretions- und Prozessierungssignale aus Killertoxinen erlauben die effiziente Expression und Sekretion heterologer Proteine in Hefen (Heintel *et al.*, 2001; Schmitt und Breinig, 2002).

Die genetische Grundlage der Killer-Charakteristik kann wie bei *Kluyveromyces lactis* auf doppelsträngigen DNA-Plasmiden beruhen oder chromosomal kodiert sein, wie in *Williopsis californica* (Gunge *et al.*, 1981; Theisen *et al.*, 2000). Die bislang am intensivsten untersuchten Killerhefen gehören jedoch der Gattung *Saccharomyces* an und erhalten ihren Phänotyp durch zytoplasmatisch vererbte dsRNA-Viren (Tipper und Schmitt, 1991). In Killerstämmen sind stets zwei dsRNA-Genome vorhanden, die in Form von „virus like particles“ (VLP) encapsidiert sind. Die genetische Information für die toxische Komponente liegt in Form des M-Virus vor, das für dessen Replikation auf ein L-A-Helfervirus angewiesen ist. Das Genom des L-A-Virus aus der *Totiviridae*-Familie enthält auf dem (+)-RNA-Strang zwei überlappende ORF. Sie kodieren für das Hüllprotein Gag und die RNA-abhängige RNA-Polymerase, welche durch ein „frame-shift“-Ereignis als Gag-Pol-Fusionsprotein synthetisiert wird. Das toxinkodierende M-Satellitenvirus ist für die RNA-Replikation in Form des (-)-Strangs, die Synthese des (+)-Strangs und die Verpackung in virale Capside auf das L-A-Virus angewiesen (Tipper und Bostian, 1984; Schmitt und Breinig, 2002).

Durch ihren Wirkungsmechanismus und eine damit verknüpfte spezifische Immunität lassen sich die drei Killertoxine K1, K2 und K28 abgrenzen, die jeweils durch ein eigenes M-Virus kodiert sind (Hanes *et al.*, 1986, Dignard *et al.*, 1991, Breinig *et al.*, 2006). K1 gehört wie das von *Zygosaccharomyces bailii* sekretierte Zygocin zu den ionophoren Toxinen (Weiler und Schmitt 2003; Martinac *et al.*, 1990). K2 zeigt starke Ähnlichkeit in Struktur und Funktion zu K1; das Toxin wirkt ebenfalls durch Bildung von Kanälen in der Plasmamembran. Dennoch scheinen sich die Mechanismen der Interaktion

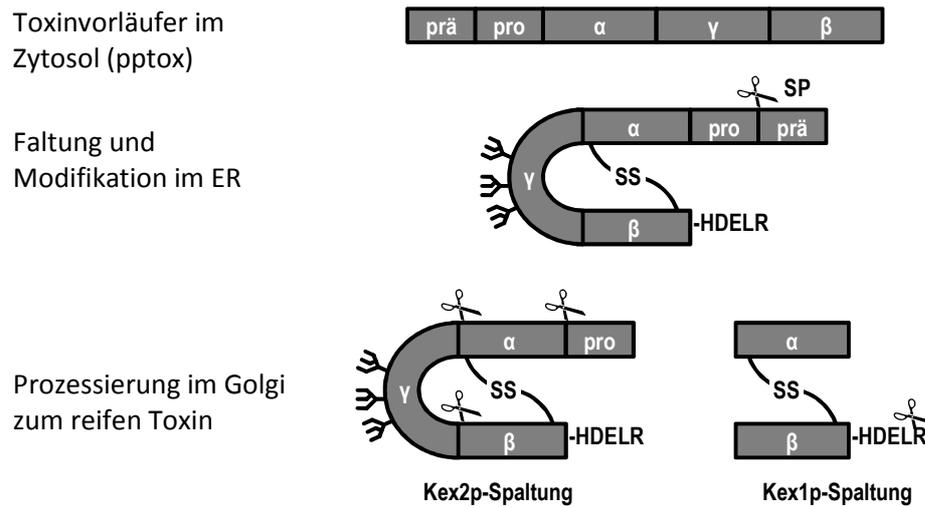
mit der Zellwand und der Membran im Detail zu unterscheiden (Novotná *et al.*, 2004). K28 hingegen zeigt trotz vergleichbarem Prozessierungs- und Sekretionsweg einen völlig verschiedenen Wirkmechanismus als K1 und K2. Nach Rezeptor-vermittelter Aufnahme und retrogradem Transport inhibiert das Toxin die DNA-Synthese und löst einen Zellzyklusarrest in der S-Phase aus. Der beobachtete Phänotyp äußert sich in einer mittelgroßen Knospe und einem haploiden Chromosomensatz des Nukleus, der vollständig in der Mutterzelle verbleibt. Werden sensitive Hefen niedrigen K28-Konzentrationen ausgesetzt, zeigen sie apoptotisches Verhalten (Schmitt *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2005).

#### **4.1 Das viral kodierte Proteintoxin K28 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

##### **4.1.1 Prozessierung und Sekretion von K28 durch den Toxin-Produzenten**

Die M28-dsRNA wurde erstmalig 1990 von Schmitt und Tipper isoliert. Sie kodiert für ein Präprotoxin, welches gleichzeitig auch die Immunität des Produzenten gegen das sekretierte K28-Toxin vermittelt (Schmitt und Tipper, 1990; Wickner, 1996; Breinig *et al.*, 2006). Das K28-Präprotoxin (pptox) aus 345 Aminosäuren zeigt als *in vitro* Translationsprodukt eine Größe von 38 kDa (Schmitt, 1995). Die Prozessierung der Toxinvorläufer zeigt trotz signifikant unterschiedlicher Sequenz auffällige Übereinstimmungen bei K28 und K1 und verläuft ähnlich zur Proinsulin-Reifung in Säuger-Zellen (Bostian *et al.*, 1984; Schmitt und Breinig, 2002). So kann die K28-pptox-Sequenz in fünf Untereinheiten unterteilt werden: die 10,5 kD große  $\alpha$ -Untereinheit, welche die Toxizität vermittelt, gefolgt von der *in vivo* N-glykosylierten  $\gamma$ -Untereinheit und der 11 kD großen  $\beta$ -Untereinheit, der die Funktion der Bindung an die Zielzelle und des retrograden Transports des reifen Toxins zukommt. Am extremen N-Terminus sorgt die hydrophobe Prä-Sequenz als ER-Import-Signal für den posttranslationalen Eintritt in den Sekretionsweg. Die Funktion der darauf folgenden Pro-Sequenz ist noch nicht geklärt, sie scheint aber bei der intrazellulären Expression von K28- $\alpha$ -Suizid-Varianten für die Toxizität notwendig zu sein (Schmitt und Breinig, 2002; Eisfeld *et al.*,

2000; Riffer *et al.*, 2002; Kelkel, 2009). Abbildung 1 zeigt schematisch wie der Toxinvorläufer im klassischen Sekretionsweg in mehreren Schritten prozessiert wird. Unmittelbar nach dem posttranslationalen Import des Vorläufers ins ER wird durch eine Signalpeptidase die N-terminale Prä-Sequenz abgespalten. Die  $\gamma$ -Sequenz wird über N-Glykosylierung modifiziert, während die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit durch die Proteindisulfidisomerase über eine Disulfidbrücke zwischen  $\alpha$ -Cys<sub>56</sub> und  $\beta$ -Cys<sub>340</sub> verknüpft werden. Die nächsten Prozessierungsschritte erfolgen in späten Kompartimenten des Golgi. Dort erkennt die Endopeptidase Kex2p drei Spaltungsstellen, die zwischen der Pro- und der  $\alpha$ -Sequenz, sowie unmittelbar am N- und am C-Terminus der  $\gamma$ -Untereinheit vorliegen, so dass jene entfernt wird. Die Carboxypeptidase Kex1p katalysiert die Prozessierung des  $\beta$ -C-Terminus, so dass die endgültige Konformation erreicht und das endständige HDEL-Motiv des Toxins freigelegt wird. Die besondere Bedeutung dieses Prozessierungsschritts wird am Phänotyp von Hefen sichtbar, welche eine Toxinvariante ohne den maskierenden Arginin-Rest exprimieren. Diese Zellen sind immun gegen alle toxischen K28-Derivate, töten aber selbst sensitive Zellen nicht. Der C-terminale Arginin-Rest muss also das HDEL-Motiv im frühen Sekretionsweg des Produzenten maskieren, um die Retention im ER zu verhindern. Vor der Sekretion muss dieser Rest jedoch entfernt werden, so dass das HDEL-Motiv in sensitiven Zellen den Golgi-ER-Transport vermitteln kann (Eisfeld, 2001). Das reife Toxin weist eine Größe von 21 kDa auf und wird über sekretorische Vesikel ins Außenmedium freigesetzt.

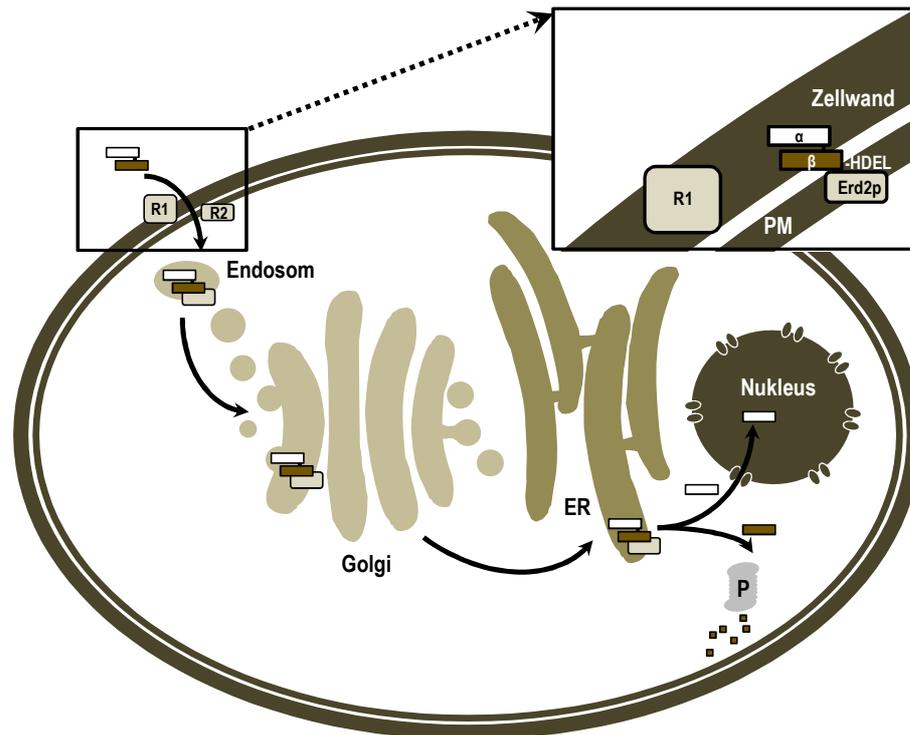


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung des K28-Vorläuferproteins im Sekretionsweg von *Saccharomyces cerevisiae*.**

In Modifikations- und Prozessierungsschritten unter Beteiligung der Signalpeptidase (SP), der Endopeptidase Kex2p und der Carboxypeptidase Kex1p reift der K28-Toxinvorläufer zum  $\alpha/\beta$ -Heterodimer aus, das sekretiert wird (verändert nach Riffer *et al.*, 2002 und Schmitt und Breinig, 2006).

#### 4.1.2 Aufnahme von K28 in sensitiven Zielzellen

Für die drei in *Saccharomyces cerevisiae* beschriebenen Killertoxine K1, K2 und K28 existiert ein gemeinsamer zweistufiger Aufnahmemechanismus (vgl. Abbildung 2). Sensitive Zielzellen tragen auf ihrer Oberfläche den Primärrezeptor in der Zellwand. Für K1 und K2 handelt es sich bei diesem Rezeptor um  $\beta$ -1,6-D-Glukan, K28 nutzt ein hochmolekulares  $\alpha$ -1,3-Mannoprotein. Die energieunabhängige Bindung an den Zellwandrezeptor könnte das Toxin sowohl auf Ebene der Zellwand konzentrieren als auch den Kontakt zur darunterliegenden Zellmembran erleichtern (Al-Aidroos und Bussey, 1978; Hutchins und Bussey, 1983; Schmitt und Radler, 1987; 1988). Mit Kre1p konnte der Sekundärrezeptor für K1 auf Ebene der Membran eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich um ein O-glykosyliertes Protein, das mit Hilfe einer GPI-Verankerung zur Membran gelangt und auch an der Synthese des Primärrezeptors beteiligt ist (Breinig *et al.*, 2002; 2004).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aufnahme und des intrazellulären Transports des Toxins K28 in *Saccharomyces cerevisiae*.**

Nach dem derzeitigen Modell wird K28 über einen zweistufigen Mechanismus aufgenommen. Der Primärrezeptor (R1) ist ein hochmolekulares Mannoprotein der Zellwand. Auf Ebene der Plasmamembran (PM) wird das Toxin anhand seines HDEL-Motivs am  $\beta$ -C-Terminus von Erd2p (R2) erkannt. Der Rezeptor/Toxin-Komplex wird internalisiert und retrograd über Endosomen und Golgi-Apparat bis zum ER transportiert. Nach der Retrotranslokation des Toxins dissoziieren beide Untereinheiten im Zytosol. Die  $\beta$ -Untereinheit wird der Degradation über das Proteasom (P) zugeführt. Die  $\alpha$ -Untereinheit diffundiert in den Zellkern und entfaltet ihre toxische Wirkung (verändert nach Schmitt und Breinig, 2006).

Auch für K28 steigt die Zahl der Hinweise auf einen spezifischen Plasmamembran-Rezeptor. K28 übt nicht wie K1 bereits an der Membran seine toxische Wirkung aus, sondern wird endozytotisch aufgenommen und retrograd bis ins Zytosol der sensitiven Zielzelle transportiert (Eisfeld *et al.*, 2000). Für die Existenz eines rezeptorvermittelten Prozesses spricht die Kinetik der Toxinaufnahme. Bereits zehn Minuten nach Toxin-Zugabe ist K28 im Zytosol sensitiver Zielzellen nachweisbar. Diese hohe Geschwindigkeit ist vergleichbar mit der raschen Endozytose des Cholera- und des Shiga-Toxins (Eisfeld *et al.*, 2000; Majoul *et al.*, 1996; Sandvig *et al.*, 1994). Spindler konnte 2004 an heterolog exprimierten K28-GFP-Derivaten mit C-terminalem ER-

Retentionssignal die entscheidende Bedeutung des HDEL-Motivs für die Endozytose bestätigen. Erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Erd2GFP-Derivaten in *end3*-Mutanten deuteten an, dass Erd2p bei Defekten in frühen Schritten der Endozytose in der Plasmamembran akkumuliert. Damit scheint es plausibel, dass der HDEL-Rezeptor in Hefe nicht nur in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats vorkommt, sondern über intrazelluläre Transportprozesse bis zur Plasmamembran gelangen kann (Heiligenstein, 2008). Dort kann Erd2p als Sekundärrezeptor das Toxin K28 binden, so dass ein Rezeptor/Ligand-Komplex entsteht, der internalisiert und retrograd bis zum ER transportiert wird. *erd2*-Mutanten zeigten sich als K28-resistent, die Sensitivität wurde jedoch durch eine plasmidgetriebene Expression von *ERD2* wieder hergestellt (Mentges, 1997). Dieser Phänotyp wurde bisher auf eine Notwendigkeit der Interaktion von K28 mit Erd2p im retrograden Transportweg zurückgeführt. Es steht jedoch zu vermuten, dass Erd2p schon zu einem früheren Zeitpunkt, bereits bei der Endozytose von K28, eine essentielle Rolle spielt. Ein beispielhaftes Indiz hierfür ist die verstärkte Aufnahme von K28 durch Hefezellen nach Überexpression von *ERD2*-Derivaten auf „multi copy“-Plasmiden (Ries, 2004). Eisfeld bestätigte in ihrer Dissertation (2001) die Relevanz des  $\beta$ -C-terminalen HDEL-Motivs für den retrograden Transport des K28-Toxins. Anhand dieses Motivs erfolgt die Erkennung des Rezeptor/Ligand-Komplexes und sein retrograder Transport über COPI-beschichtete Vesikel vom trans-Golgi-Netzwerk bis zum ER.

Diese Strategie nutzen auch andere Toxine, die ihre Wirkung im Zellinnern entfalten müssen (Lord und Roberts, 1998). Das Cholera-Toxin (CT) und das „heat labile“-Enterotoxin (LT) aus *Escherichia coli* tragen die HDEL-ähnlichen Retentionssignale KDEL und RDEL. Diese Motive scheinen zwar für die Toxizität nicht essentiell zu sein, können den Transport und die biologische Aktivität aber maximieren (Cieplak *et al.*, 1995; Lencer *et al.*, 1995). Der C-Terminus des *Pseudomonas* Exotoxins (PE) lautet REDLK und wird in Säugerzellen vom KDEL-Rezeptor erkannt und transportiert. Die Deletion dieses Motivs führt zum Verlust der cytotoxischen Aktivität, während diese

durch das Anfügen des starken Retentionssignals KDEL für Säuger im Vergleich zum wildtypischen Toxin verdoppelt werden kann (Jackson *et al.*, 1999; Chaudhary *et al.*, 1989; Seetharam *et al.*, 1991). Wird das KDEL-Motiv an den C-Terminus der A-Untereinheit des Pflanzentoxins Ricin (RTA) angefügt, ist die Zytotoxizität in Säugerzellen signifikant erhöht (Wales *et al.*, 1993).

Ist das Toxin K28 im ER der sensitiven Zielzelle angekommen, muss es die ER-Membran überwinden, um über das Zytosol bis zu seinem Zielort, dem Zellkern zu gelangen. Schon seit 1997 ist bekannt, dass der Sec61-Kanal nicht nur als Translokation zum Import sekretorischer Proteine dient, sondern auch die Dislokation fehlgefalteter Proteine aus dem ER ins Zytosol vermittelt, wo diese abgebaut werden (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997). Mutanten, die temperaturabhängig einen Defekt im Sec61-Komplex aufweisen, zeigten sich in Sensitivitätsstudien als resistent gegen K28 (Eisfeld, 2001). Auch in diesem Transportschritt zeigen sich Parallelen von K28 zu anderen Toxinen, die ebenfalls diese Route nutzen, um aus dem ER zu gelangen, dabei aber weitgehend dem Abbau entgehen. Die A1-Untereinheit des Cholera-Toxins und die Ricin-Untereinheit RTA nutzen ebenfalls den Sec61-Kanal zur ER-Zytosol-Dislokation (Hazes und Read, 1997; Schmitz *et al.*, 2000; Lord *et al.*, 2003). Die Toxine scheinen dabei den natürlichen Weg zum Ausschleusen fehlgefalteter Proteine zu nutzen, der als ER-assoziierte Degradation (ERAD) beschrieben ist und an dem außer Sec61p zahlreiche akzessorische Proteine Anteil haben (Ellgaard und Helenius, 2003;).

Heiligenstein bestätigte in ihrer Dissertation (2008) die Beteiligung der DnaJ-ähnlichen Chaperone Jem1p und Scj1p sowie der Proteindisulfidomerase an der Dislokation von K28 aus dem ER. Des Weiteren wird das Hsp70-Chaperon BiP und das Hsp40-Chaperon Sec63p benötigt (Eisfeld, 2001). Hingegen zeigte sich kein Einfluss der klassischen ERAD-Komponenten wie Cdc48p oder seiner Kofaktoren Ufd1p und Npl4p auf die Retrotranslokation. Auch Defekte in Komponenten der Erkennungs- und Degradationsmaschinerie des Proteasoms zeigten keinen Einfluss. Interessanterweise scheint K28 also in der Mechanistik seiner ER-Zytosol-Translokation von dem klassischen ERAD-Weg abzuweichen (Heiligenstein *et al.*, 2006).

Nachdem das entfaltete Heterodimer das ER verlassen hat, wird unter reduzierenden Bedingungen des Zytosols die Disulfidbrücke aufgebrochen und das Toxin dissoziiert in beide Untereinheiten. Während die  $\beta$ -Untereinheit an der Position Lys<sub>294</sub> ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird, entzieht sich die  $\alpha$ -Untereinheit größtenteils dem Abbau und bewirkt im Zellkern ihren toxischen Effekt (Heiligenstein *et al.*, 2006).

#### **4.1.3 Wirkmechanismus von K28**

Die Wirkungsweise von K28 zeigt sich im Gegensatz zu anderen Killertoxinen, welche Zielzellen meist über ionophore Schädigung der Plasmamembran-Integrität abtöten, in einem bisher einmaligen zytotoxischen Mechanismus (Weiler und Schmitt, 2002; Breinig *et al.*, 2002 ; Novotná *et al.*, 2004). K28 gelangt vermutlich durch seine geringe Größe über passive Diffusion in den Zellkern und inhibiert dort die DNA-Synthese. Dieser Effekt zeigt sich morphologisch in einer Zelle mit mittelgroßer Knospe und einer Blockade des Zellzyklus in der S-Phase (Schmitt *et al.*, 1996).

Die Kernlokalisierung von K28  $\alpha$  konnte bisher weder in Zellkernisolaten noch durch mikroskopische Analyse fluoreszenzmarkierter Derivate erbracht werden (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Das Anfügen eines Kernlokalisierungssignals (NLS) des SV40-Virus führte jedoch zu einer signifikanten Steigerung der K28-Toxizität, was die direkte Wirkung im Zellkern bestätigt. Die Funktion im Zellkern wurde schließlich durch den Nachweis einer direkten Interaktion der  $\alpha$ -Untereinheit mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und des „anaphase promoting complex“ (APC) verifiziert (Reiter, 2004). Der exakte Ablauf der toxischen Ereignisse, die  $\alpha$  im Kern auslöst, ist noch nicht entschlüsselt. Die Toxinkonzentration scheint jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkweise zu haben.

Bei niedrigen Toxinkonzentrationen, wie sie auch natürlicherweise in Hefemischkulturen vorkommen, konnte die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Beteiligung der Caspase Yca1p nachgewiesen werden. Die Akkumulation von ROS, die Fragmentierung der DNA und die Veränderung der Plasmamembranzusammensetzung sind klassische

Anzeichen eines apoptotischen Zelltods. Dagegen lösen hohe Konzentrationen des Toxins nekrotische Vorgänge aus, welche nicht Caspase-vermittelt sind und keine ROS-Bildung bedingen (Reiter *et al.*, 2005; Schmitt und Reiter, 2008).

#### **4.1.4 Immunität gegen K28**

Toxin-Produzenten zeigen den gleichen Zellwandaufbau, die gleiche Proteinzusammensetzung der Plasmamembran und besitzen die gleichen Ziele zum Angriff des Toxizitätsmechanismus wie sensitive *Saccharomyces cerevisiae* Stämme. Somit steht einem sezernierten Toxin der gleiche Transportmechanismus in die Produzenten-Zelle zur Verfügung.

Der Mechanismus der Immunität von K1-Killerstämmen gegen das eigene Toxin ist noch nicht detailliert beschrieben, basiert aber vermutlich auf einer Interaktion des Sekundärrezeptors Kre1p mit dem K1-Protoxin im Sekretionsweg. In Folge dessen wird die Transportroute des Rezeptor/Protoxin-Komplexes zur Vakuole umgeleitet. Die zentrale Komponente des K1-Immunitätsmechanismus stellt ein N-terminales Fragment der  $\gamma$ -Untereinheit des Toxinvorläufers dar (Schmitt und Breinig, 2006; Sturley *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 1993).

Bei K28 wird die Immunität auf eine vollkommen andere Weise vermittelt; die Aufnahme des Toxins durch den Produzenten selbst wird nicht verhindert. Tatsächlich können der K28-Toxin-Vorläufer und das reife Toxin-Heterodimer gleichzeitig im Zytosol von K28-Killerstämmen nachgewiesen werden. Die extrazelluläre Zugabe von K28 zu toxinproduzierenden Zellen steigerte die Menge an intrazellulär nachweisbarem Toxin (Schmitt und Breinig, 2002; Breinig *et al.*, 2006).

Die Immunität des Killerstamms gegen das eigene Toxin muss somit durch eine Inaktivierung des aufgenommenen Toxins im Zytosol umgesetzt werden, bevor das Toxin seinen Wirkungsort im Zellkern erreichen kann. Eine Beschleunigung des ER-Import-Prozesses hat fatale Auswirkungen auf die Immunität von K28-Produzenten. Wird das K28-eigene Signal für den posttranslationalen ER-Import durch eine Signalsequenz für den

kotranslationalen ER-Import ersetzt und damit die Verweildauer des Toxinvorläufers im Zytosol verringert, zeigt der Killerstamm eine gesteigerte Sensitivität für sein eigenes Toxin. Dieses Ergebnis lieferte den ersten Hinweis, dass der unreife Toxinvorläufer das entscheidende Element bei der Ausprägung der Immunität ist (Breinig *et al.*, 2006).

Die intrazelluläre Expression der  $\alpha$ -Untereinheit ist zwar notwendig, um eine Immunität zu entwickeln, reicht jedoch alleine nicht aus. Erst die sequenzspezifische Verlängerung der  $\alpha$ -Untereinheit am C-Terminus resultiert in der Ausbildung einer vollständigen Immunität. Dies erklärt auch die Immunität von *kex2*-Mutanten, die wegen des Defekts in der Prozessierung zwar kein funktionelles Toxin sekretieren können, aber durch den unvollständig prozessierten Toxin-Vorläufer vor reifem K28 geschützt sind (Schmitt und Tipper, 1995). Breinig *et al.* gelang 2006, die direkte Interaktion eines His-markierten K28-Vorläufers mit internalisiertem reifem K28 in zytosolischen Komplexen nachzuweisen.

Inzwischen ist auch der nächste Schritt im Immunitätsprozess aufgeklärt. Toxinproduzenten mit konditionalen Proteasom-Mutationen sowie Hefen, die ein lysinfreies K28-Derivat exprimieren, zeigten sich nicht mehr resistent gegen reifes K28. Weitere Ergebnisse zeigten, dass ohne die Bildung funktioneller Polyubiquitinketten (nach Überexpression der Ubiquitin-Variante Ub-RR<sub>48/63</sub>) oder bei Reduktion des intrazellulären Niveaus an Ubiquitin-Monomeren (bei Deletion der Deubiquitinase Doa4) ein Immunitätsverlust auftritt. Auf diesen Daten basiert das aktuelle mechanistische Modell der K28-Immunität Virus-infizierter *S. cerevisiae* Killerstämme. Reinternalisierte K28-Heterodimere interagieren spezifisch mit dem Vorläuferprotein im Zytosol des Toxinproduzenten. Der Komplex aus unreifem und reifem Toxin wird ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Der posttranslationale Import ins ER hält die Sekretion des Toxins aufrecht und bildet den Killerphänotyp aus, während das zytosolische Niveau an freien Toxinvorläufer-Molekülen hoch genug bleibt, um aufgenommenes K28-Toxin abzufangen und zu neutralisieren (Breinig *et al.*, 2006).

## 5. Ziele und Fragestellung der Arbeit

Frühere Untersuchungen von Eisfeld (2001) und Heiligenstein (2008) weisen auf die Funktion des HDEL-Rezeptors Erd2p als Sekundärrezeptor des viral kodierten Killertoxins K28 in Hefe hin. Für den Rezeptor ist bisher eine Lokalisation im ER und in Golgi-Kompartimenten beschrieben, die mit seiner Funktion beim Rücktransport ER-residenter löslicher Proteine aus dem späteren Sekretionsweg korreliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob eine Subfraktion der zellulären HDEL-Rezeptoren tatsächlich bis zur Plasmamembran gelangt. Um die Lokalisation von Erd2p mikroskopisch in lebenden Hefezellen zu erfassen, sollten fluoreszenzmarkierte Rezeptor-Derivate in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und ihre intrazelluläre Verteilung über konfokale Laserscanning-Mikroskopie untersucht werden. Neben Kollokalisationsstudien mit Markerproteinen für zelluläre Substrukturen sollte auch ein zweites *in vivo*-Testsystem angewendet werden. Hierbei sollte Erd2p in einem Fusionsprotein an einen Reporter gekoppelt werden, der bei Lokalisation an der Plasmamembran über Aktivierung eines Signalwegs das Wachstum von temperatursensitiven Hefezellen stimuliert.

In einem weiteren Projekt sollte der Rezeptor Erd2p auf seine Topologie untersucht werden. Nach Erstellung eines *in silico* Modells über Programme zur Topologie-Vorhersage anhand der Primärsequenz sollte dieses Modell experimentell überprüft werden.

Die Kenntnis der *in vivo* Topologie sollte es schließlich ermöglichen, potentielle Endozytose motive in der Rezeptorsequenz zu identifizieren. Es galt, durch Deletion oder Substitution dieser Endozytosesignale ihren Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors und dessen Beteiligung an der Endozytose des K28-Toxins zu prüfen. Besonderes Augenmerk sollte auf einer möglichen Ubiquitinierung des Rezeptors liegen, da bereits in früheren Arbeiten die Bedeutung der Ubiquitinligase Rsp5p für die Internalisierung des Rezeptor/Toxin-Komplexes vorgeschlagen wurde.

## II Material und Methoden

### 1. Organismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen und sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Tabelle 3 zeigt die Eigenschaften der *Saccharomyces cerevisiae* Stämme, die in dieser Arbeit konstruiert wurden.

#### 1.1 Bakterienstämme

**Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme, deren Genotyp und Herkunft.**

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP 10 F'	F' {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen
NovaBlue GigaSingles	endA1 hsdR17 (r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> ZΔM15::Tn10] (Tet <sup>R</sup> )	Novagen

#### 1.2 Hefestämme

**Tabelle 2: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme, deren Genotyp und Herkunft.**

<i>S. cerevisiae</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
BY4742	MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0	Open Biosystems
cdc25-2	MATα ura3 leu2 trp1 hisΔ200 ade2-101	Broder et al., 1998
YBL040cGFP clone	MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ERD2::ERD2GFP HIS3MX	Invitrogen
YA12	MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pYA12[2μ URA3 ADE3 SEC12]	Semenza et al., 1990
YW01	Mata prc1-1 trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112	Seufert und Jentsch, 1990
YW013	Mata, ubc4::HIS3	Seufert und Jentsch, 1990

**Tabelle 3: In dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae* Stämme und deren Genotyp.**

Die aufgeführten *S. cerevisiae* Stämme wurden in dieser Arbeit durch Modifikation aus YA 12 (vgl. Tabelle 2) durch Einbringen von pJD.1-Derivaten zur Expression von ERD2-Varianten und anschließender FOA-Selektion hergestellt (vgl. Ergebnisse, Punkt 3.2.1).

<i>S. cerevisiae</i> Stamm	Genotyp	Plasmid
YA ERD2	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2]</i>	pJD.1ERD2
YA ERD2-NPF	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2-NPF]</i>	pJD.1ERD2-NPF
YA ERD2K/R	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2K/R]</i>	pJD.1ERD2K/R
YA ERD2-T <sub>207</sub>	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2-T<sub>207</sub>]</i>	pJD.1ERD2-T <sub>207</sub>
YA ERD2T <sub>207</sub> A	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2T<sub>207</sub>A]</i>	pJD.1ERD2T <sub>207</sub> A
YA ERD2T <sub>207</sub> L	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2T<sub>207</sub>L]</i>	pJD.1ERD2T <sub>207</sub> L
YA ERD2+KTN	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2+KTN]</i>	pJD.1ERD2+KTN
YA ERD2EGFP	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2EGFP]</i>	pJD.1ERD2EGFP
YA ERD2EGFP <sub>IST2C</sub>	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 erd2-Nco pJD.1[2<math>\mu</math> LEU2 ERD2EGFP<sub>IST2C</sub>]</i>	pJD.1 ERD2EGFP <sub>IST2C</sub>

## 2. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit zur Klonierung verwendeten Plasmide wurden der Plasmid-Sammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen und sind in Tabelle 4 beschrieben. Tabelle 5 enthält die Auflistung der in dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektoren. Detaillierte Plasmidkarten sind unter Punkt 2.1 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide, deren Eigenschaften und Herkunft

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pRS316	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), „autonomously replicating sequence“ (ARS), <i>URA3</i> - und <i>Amp<sup>R</sup></i> -Gen	Sikorski und Hieter, 1989
pRS315	„shuttle“-Vektor mit „yeast centromere sequence“ (CEN), „autonomously replicating sequence“ (ARS), <i>LEU2</i> - und <i>Amp<sup>R</sup></i> -Gen	Sikorski und Hieter, 1989
pYES2.1/V5-His-TOPO	“TA-Cloning“-Vektor, erlaubt Klonierung eines Taq-amplifizierten PCR-Produkts, ermöglicht Expression in Hefe mit induzierbarem <i>GAL1</i> -Promotor, <i>URA3</i> - und <i>Amp<sup>R</sup></i> -Gen	Invitrogen
pSTBlue1	“TA-Cloning“-Vektor, erlaubt Klonierung eines Taq-amplifizierten PCR-Produkts, <i>Amp<sup>R</sup></i> -Gen, ermöglicht Blau/Weiß-Selektion	Novagen
pESCLEU	„shuttle“-Vektor mit 2 $\mu$ “origin of replication”, <i>LEU2</i> - und <i>Amp<sup>R</sup></i> -Gen, erlaubt Expression hinter <i>GAL1</i> - oder <i>GAL10</i> -Promotor	Stratagene
pUL28	Expressionsvektor Deg1-yEGFP	Lenk und Sommer, 2000
pmCherry	Säuger-Expressionsvektor, enthält mCherry-Sequenz	Clontech
pMet425-Myc-Ras	enthält myc-getaggttes RAS-Gen	Broder <i>et al.</i> , 1998
pADNS-JZ-Ras	erlaubt Expression von c-Jun Leucin Zipper-RAS-Fusion	Broder <i>et al.</i> , 1998
pUra-M-JDP2	erlaubt Expression von myristyliertem JDP2	Broder <i>et al.</i> , 1998
pAF18	enthält Kex2-GFP-IST2878-941-Fusion	Franz <i>et al.</i> , 2007
YlpSTE/SUC2-CAN1	enthält STE2-SUC2-CAN1-Fusion	Cartwright und Tipper, 1991
pRS315CAN1 mCherry	erlaubt Expression von CAN1-mCherry-Fusionsgen unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Sevrieva, 2008
pRS315PIL1 mCherry	erlaubt Expression von CAN1-mCherry-Fusionsgen unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Sevrieva, 2009
pRS315SUR7 mCherry	erlaubt Expression von CAN1-mCherry-Fusionsgen unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Sevrieva, 2009

pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.93 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.93 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.147 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.147 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.291 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.291 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.363 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.363 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.462 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.462 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.546 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.546 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316P <sub>GAL1</sub> Erd2.657 V5-Suc2A- His3CYC1TT	erlaubt Expression von ERD2.657 mit V5-SUC2A-HIS3-Reportersystem unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316MN	Centromervektor zur Expression des N-terminalen Teils von mCherry (bp 1-477) unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Schorr, 2009
pRS315MC	Centromervektor zur Expression des C-terminalen Teils von mCherry (bp 488-711) unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator	Schorr, 2009
pYSCE	Vektor enthält das wildtypische <i>ERD2</i> -Gen und einen LEU2-Marker	Pelham

**Tabelle 5: In dieser Arbeit konstruierte Expressionsvektoren und deren Eigenschaften**

Expressionsvektor	Eigenschaften
pJD.6 ERD2yEGFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>yEGFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2yEGFPA <sub>206</sub> K	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und einer <i>yEGFP</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese monomerische EGFP-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 206 (Ala → Lys) und liegt rein monomerisch vor
pJD.6 ERD2yEGFPIST2C	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>yEGFP</i> mit der kodierenden Sequenz für die 69 letzten AS von <i>IST2</i> am C-Terminus unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2-NPFyEGFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus einer <i>ERD2</i> -Variante und aus <i>yEGFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; die kodierende Sequenz für das N-terminale NPF-Signal ist in dieser <i>ERD2</i> -Variante deletiert
pJD.6 ERD2K/RyEGFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus einer <i>ERD2</i> -Variante und <i>yEGFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante besitzt Punktmutationen, die zum AS-Austausch (Lys → Arg) an den Positionen 208, 213, 216 und 219 führen
pRS316 ERD2-T <sub>207</sub> yEGFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus einer <i>ERD2</i> -Variante und <i>yEGFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; in dieser <i>ERD2</i> -Variante ist das Codon für Thr <sub>207</sub> deletiert
pJD.5 ANP1mCherry	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ANP1</i> und mCherry unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.5 PMA1mCherry	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>PMA1</i> und mCherry unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 SEC63RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>SEC63</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.1RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 93 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.2RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 147 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator

pJD.6 ERD2.3RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 291 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.4RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 363 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.5RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 462 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.6RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 546 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.7RAS	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 657 bp von <i>ERD2</i> und <i>RAS</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.1SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 93 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.2SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 147 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.3SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 291 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.4SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 363 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.5SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 462 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.6SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 546 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.7SUC2AV5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 657 bp von <i>ERD2</i> und dem C-terminalen Glykosylierungsreporter <i>SUC2AV5</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.1ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 93 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator

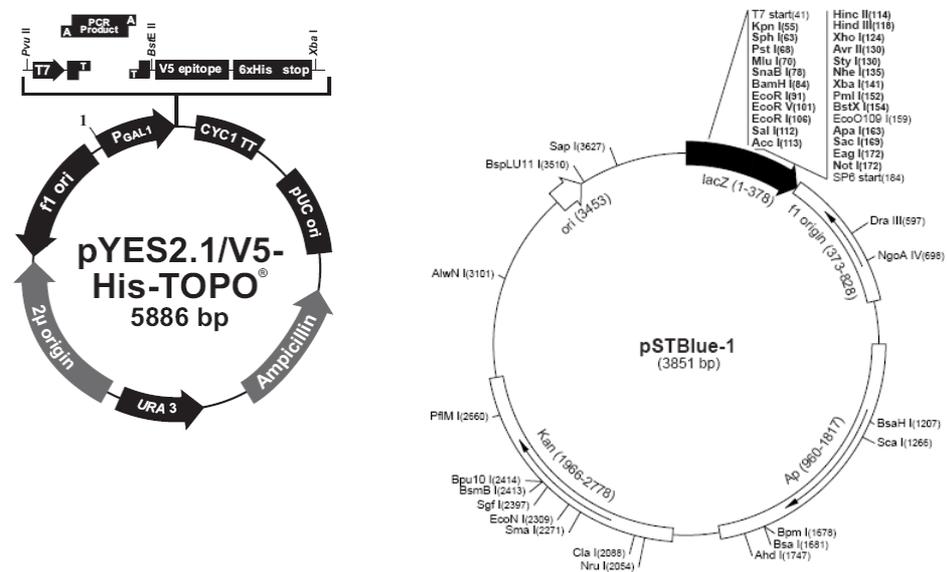
pJD.6 ERD2.2ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 147 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.3ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 291 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.4ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 363 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.5ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 462 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.6ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 546 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2.7ro2GFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus den ersten 657 bp von <i>ERD2</i> und dem Gen der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ro2GFP	Centromervektor zur zytosolischen Expression der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 SSro2GFPHDEL	Centromervektor zur Expression der redoxsensitiven GFP-Variante <i>ro2GFP</i> mit der kodierenden Sequenz für ein N-terminales Sekretionssignal aus <i>KAR2</i> und für ein C-terminales HDEL-Signal unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.5 ERD2	Centromervektor zur Expression von wildtypischem <i>ERD2</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.5 ERD2-NPF	Centromervektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; die kodierende Sequenz für das N-terminale NPF-Signal ist in dieser <i>ERD2</i> -Variante deletiert
pJD.5 ERD2K/R	Centromervektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante besitzt Punktmutationen, die zum AS-Austausch (Lys → Arg) an den Positionen 208, 213, 216 und 219 führen
pJD.5 ERD2-T207	Centromervektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; in dieser <i>ERD2</i> -Variante ist das Codon für Thr <sub>207</sub> deletiert

pJD.5 ERD2T207A	Centromervektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante enthält eine Mutation, die zum AS-Austausch (Thr → Ala) an der Position 207 führt
pJD.5 ERD2T207L	Centromervektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante enthält eine Mutation, die zum AS-Austausch (Thr → Ala) an der Position 207 führt
pJD.5 ERD2-C	Centromervektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante hat eine Deletion der letzten 39 bp, so dass der C-Terminus bis zur letzten potentiellen Transmembraneinheit deletiert ist
pJD.5 ERD2yEGFP	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>yEGFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.5 ERD2yEGFP <sub>IST2C</sub>	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>yEGFP</i> mit der kodierenden Sequenz für die 69 letzten AS von <i>IST2</i> am C-Terminus unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.1 ERD2	2 $\mu$ -Vektor zur Expression von wildtypischem <i>ERD2</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.1 ERD2-NPF	2 $\mu$ -Vektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; die kodierende Sequenz für das N-terminale NPF-Signal ist in dieser <i>ERD2</i> -Variante deletiert
pJD.1 ERD2K/R	2 $\mu$ -Vektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante besitzt Punktmutationen, die zum AS-Austausch (Lys → Arg) an den Positionen 208, 213, 216 und 219 führen
pJD.1 ERD2-T207	2 $\mu$ -Vektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; in dieser <i>ERD2</i> -Variante ist das Codon für Thr <sub>207</sub> deletiert
pJD.1 ERD2T207A	2 $\mu$ -Vektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante enthält eine Mutation, die zum AS-Austausch (Thr → Ala) an der Position 207 führt
pJD.1 ERD2T207L	2 $\mu$ -Vektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante enthält eine Mutation, die zum AS-Austausch (Thr → Ala) an der Position 207 führt
pJD.1 ERD2-C	2 $\mu$ -Vektor zur Expression einer <i>ERD2</i> -Variante unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator; diese <i>ERD2</i> -Variante hat eine Deletion der letzten 39 bp, so dass der C-Terminus bis zur letzten potentiellen Transmembraneinheit deletiert ist
pJD.1 ERD2yEGFP	2 $\mu$ -Vektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>yEGFP</i> unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator

pJD.1 ERD2yEGFP <sub>IST2</sub> C	2 $\mu$ -Vektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und <i>yEGFP</i> mit der kodierenden Sequenz für die 69 letzten AS von <i>IST2</i> am C-Terminus unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.6 ERD2MN	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>ERD2</i> und dem N-terminalen Teil von mCherry (bp 1-477) unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.5 MCRSP5	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>RSP5</i> und dem C-terminalen Teil von mCherry (bp 488-711) unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pJD.5 MCUBC4	Centromervektor zur Expression eines Fusionsgens aus <i>UBC4</i> und dem C-terminalen Teil von mCherry (bp 488 – 711) unter Kontrolle von <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator

## 2.1 Plasmidkarten

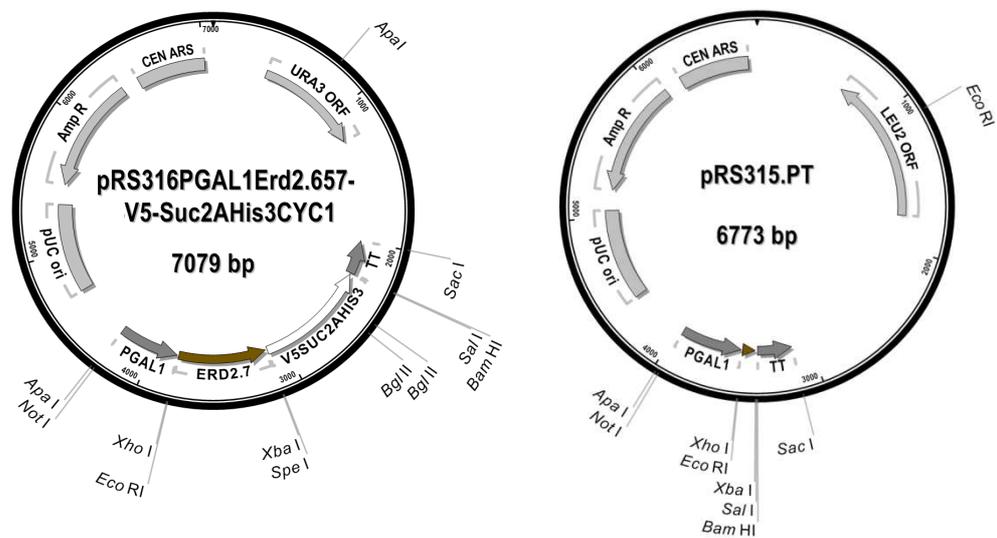
### 2.1.1 Plasmide zur Zwischenklonierung



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der zur Zwischenklonierung verwendeten Plasmide.**

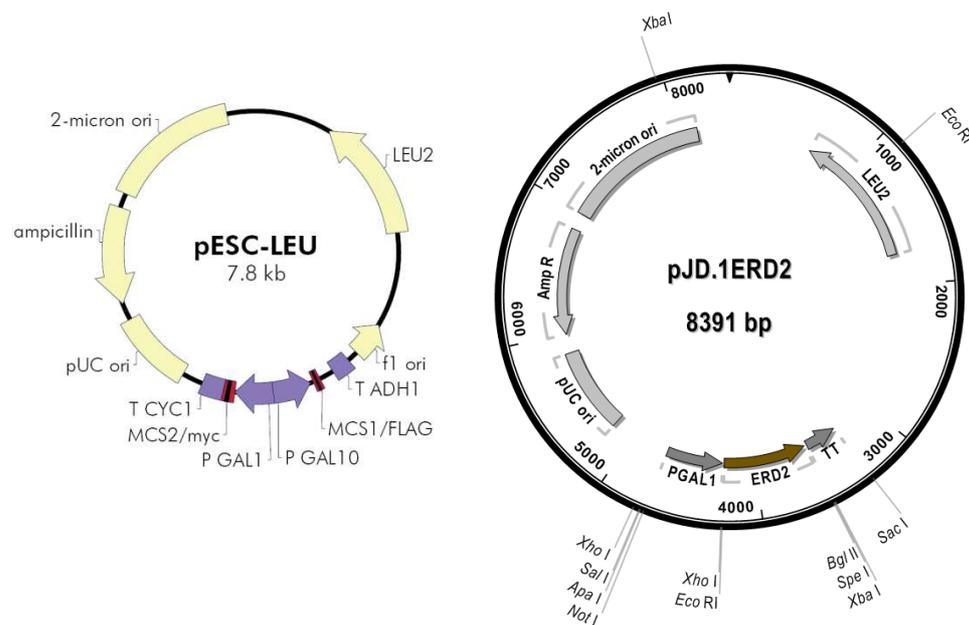
Die abgebildeten Plasmide pYES2.1/V5-His-TOPO und pSTBlue-1 wurden zur Zwischenklonierung und Sequenzierung von PCR-Amplifikaten verwendet. Beide Vektoren erlauben die Insertion von DNA-Fragmenten mit 3'A-Überhängen, wie sie während der PCR-Amplifikation durch die Taq-Polymerase angefügt werden. pYES2.1/V5-His-TOPO besitzt ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli*, bei dem Einsatz von pSTBlue-1 erfolgt die Selektion mit Kanamycin. Die Sequenzierungsreaktion wurde in pYES2.1/V5-His-TOPO mit den kommerziell erhältlichen Primern GAL1for und V5rev durchgeführt, in pSTBlue-1 mit den Primern Sp6 und T7.

### 2.1.2 Grundvektoren zur Konstruktion der Expressionsvektoren für *S. cerevisiae*



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pRS315.PT und pRS316P<sub>GAL1</sub>Erd2.657-V5-Suc2AHis3CYC1TT.**

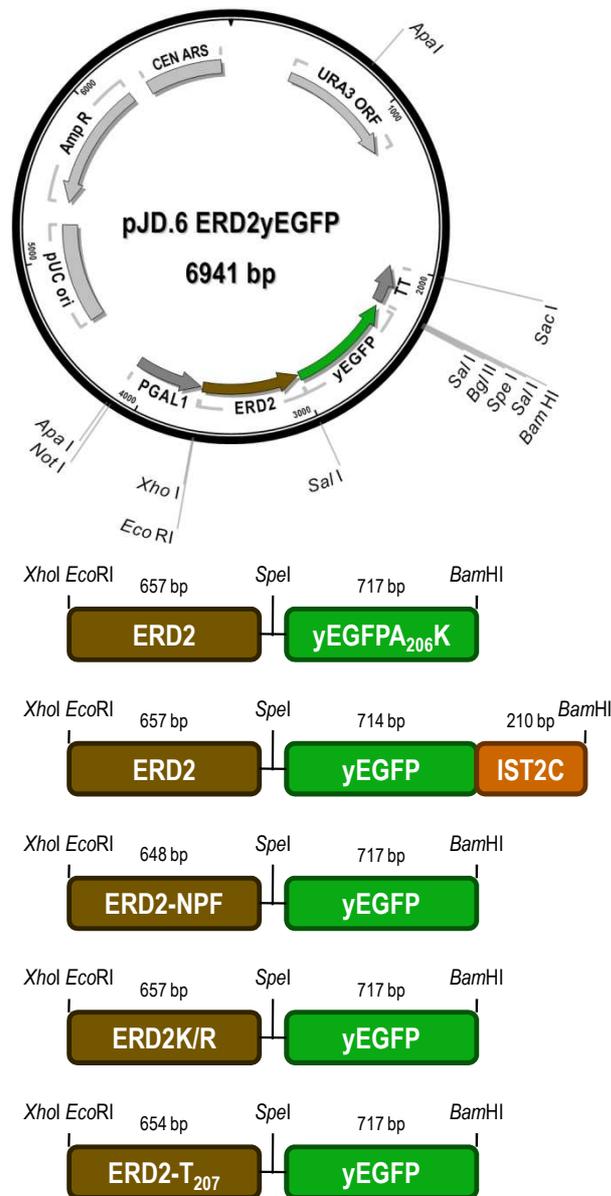
Die abgebildeten Expressionsvektoren wurden durch Modifikation von pRS316 und pRS315 (Sikorski und Hieter, 1989) hergestellt. Das Rückgrat beider Vektoren enthält eine autonom replizierende Sequenz (ARS), eine Centromersequenz (CEN), einen bakteriellen „origin of replication“ (pUC ori) und ein Ampicillinresistenz-Gen (*Amp<sup>r</sup>*). pRS316 verfügt über den Auxotrophiemarker *URA3*, pRS315 über *LEU2*. Zur induzierbaren Expression heterologer Gene wurde in beide Vektoren der Promotor P<sub>GAL1</sub> und der Terminator *CYC1* TT integriert. Der Vektor pRS316P<sub>GAL1</sub>Erd2.657-V5-Suc2AHis3CYC1TT enthält eine Genfusion aus der *ERD2*-Sequenz und einem Reporterkonstrukt (vgl. Gießelmann, 2007). Auf diesem Vektor basieren alle in dieser Arbeit eingesetzten pJD.6-Derivate, die sich nur durch die einklonierten *ERD2*-Varianten und Fusionsgene unterscheiden. Der Vektor pRS315.PT enthält ein 93 bp großes *ERD2*-Fragment (vgl. Posaric, 2008). Auf diesem Vektor basieren alle in dieser Arbeit eingesetzten pJD.5-Derivate, die sich in den einklonierten Fusionsgenen unterscheiden.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pESC-LEU und des pESC-LEU-Derivats pJD.1ERD2.**

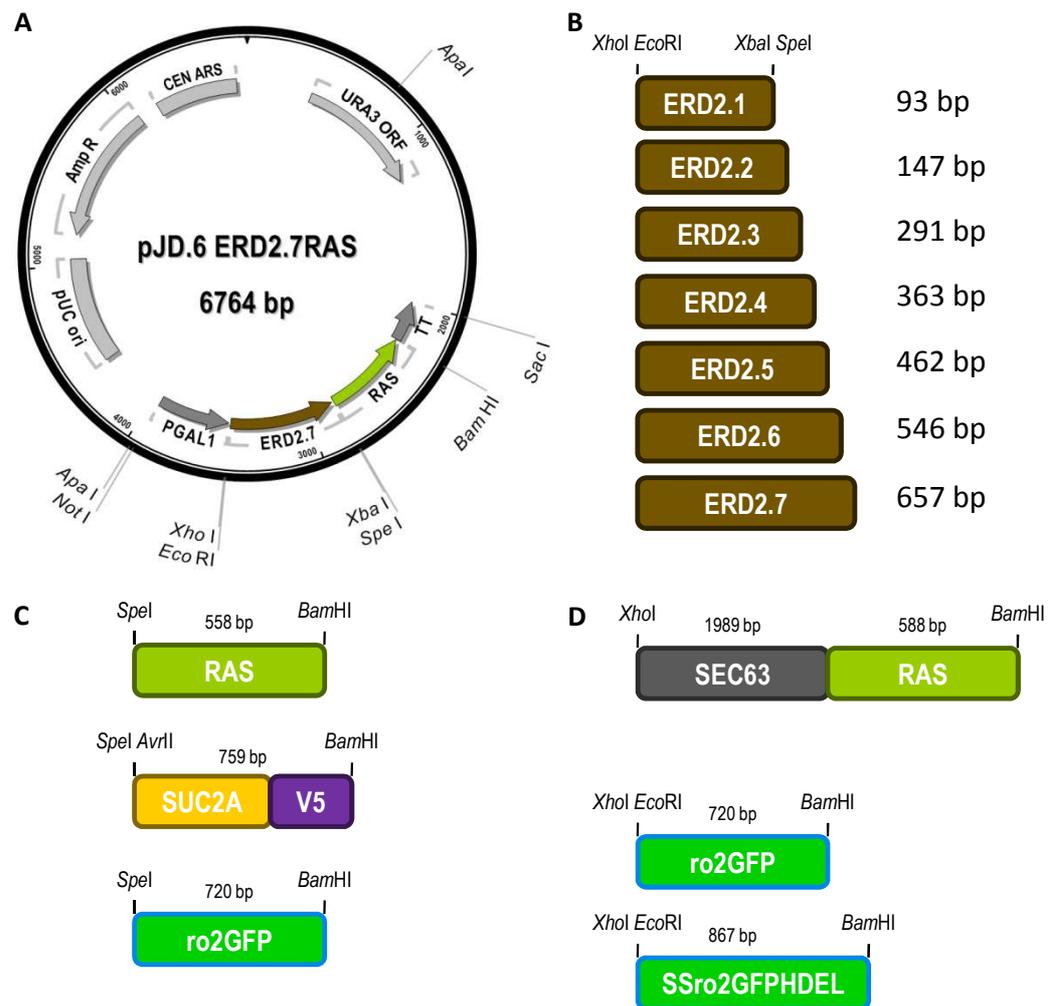
Der abgebildete Expressionsvektor pJD.1ERD2 wurde durch Modifikation von pESCLEU (Stratagene über Agilent, Waldbronn) hergestellt. Das Rückgrat des Vektors enthält einen bakteriellen „origin of replication“ (pUC ori), einen Hefe-Replikationsursprung (2 $\mu$  ori), ein Ampicillinresistenz-Gen (Amp R) und den Auxotrophiemarker *LEU2*. Die in pESCLEU enthaltenen Promotoren  $P_{GAL1}$  und  $P_{GAL10}$  wurden durch Integration eines *ApaI/SacI*-Fragments aus dem *GAL1*-Promotor ( $P_{GAL1}$ ), dem *ERD2*-Gen und dem *CYC1* Terminator (TT) aus pJD.5ERD2 zwischen MCS2 und MCS1 ersetzt. Auf diesem Vektor basieren alle in dieser Arbeit eingesetzten pJD.1-Derivate, die sich in den enthaltenen *ERD2*-Varianten unterscheiden.

## 2.1.3 Expressionsvektoren: pJD.6-Derivate



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der pJD.6-Derivate zur Expression von ERD2EGFP-Varianten.**

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Expressionsvektors pJD.6ERD2yEGFP und die schematische Darstellung aller in dieser Arbeit hergestellten und in pJD.6 klonierten ERD2EGFP-Fusionsgene. Es sind die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angegeben, wie sie nach Klonierung über *Xho*I und *Bam*HI in den Expressionsvektoren enthalten sind.

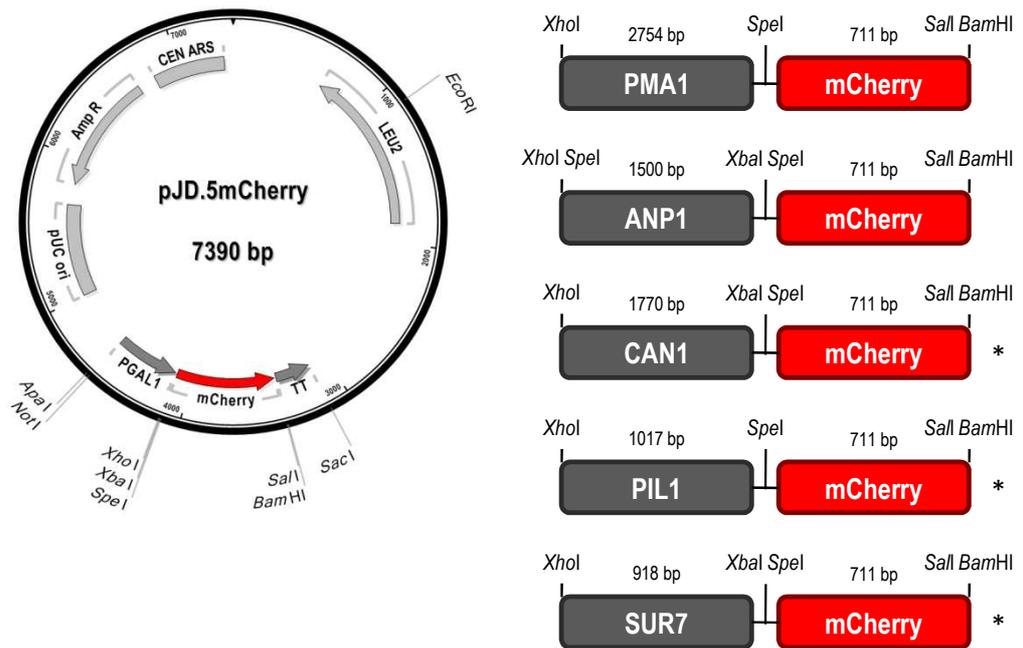


**Abbildung 7: Schematische Darstellung der pJD.6-Derivate zur Expression der ERD2-Reporter-Fusionsgene.**

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Expressionsvektors pJD.6 und die schematische Darstellung aller in dieser Arbeit hergestellten und in pJD.6 klonierten Fusionsgene aus den verkürzten ERD2-Fragmenten und den drei verwendeten Reportern. Es sind die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angegeben, wie sie nach Klonierung über XhoI und SpeI (für ERD2-Fragmente) und über SpeI und BamHI (für Reporter) in den Expressionsvektoren enthalten sind.

- (A) pJD.6
- (B) ERD2-Fragmente zur Topologie-Analyse
- (C) Reporter-Konstrukte zur Topologie-Analyse
- (D) Kontrollen zur Topologie-Analyse

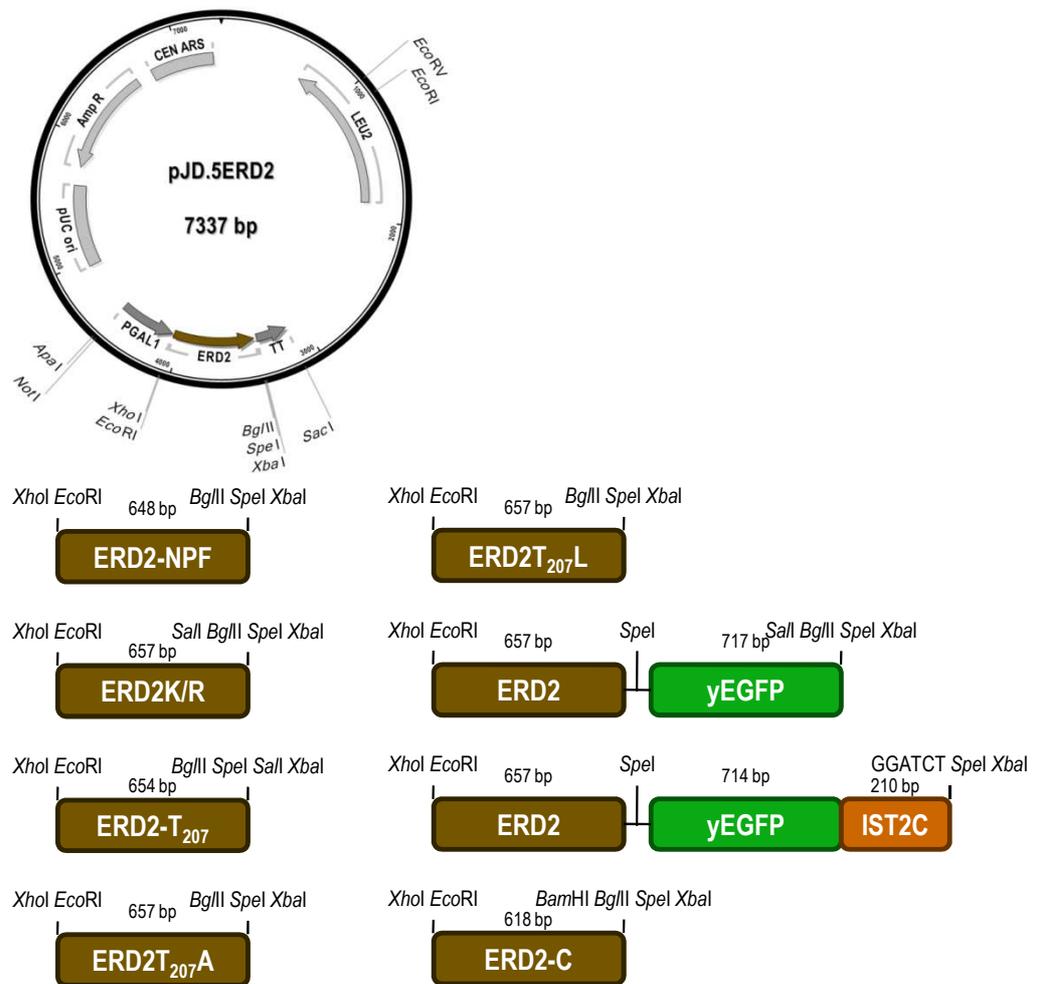
### 2.1.4 Expressionsvektoren: pJD.5-Derivate



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der pJD.5-Derivate zur Expression der mCherry-Markerproteine.**

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Expressionsvektors pJD.5 und die schematische Darstellung aller in dieser Arbeit hergestellten und in pJD.5 klonierten Fusionsgene aus den Genen der Plasmamembranmarker *PMA1*, *CAN1*, *PIL1*, *SUR7* bzw. des Golgi-Markers *ANP1* und *mCherry*. Es sind die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angegeben, wie sie nach Klonierung in den Expressionsvektoren enthalten sind.

\* vgl. Sevrieva 2008 und 2009

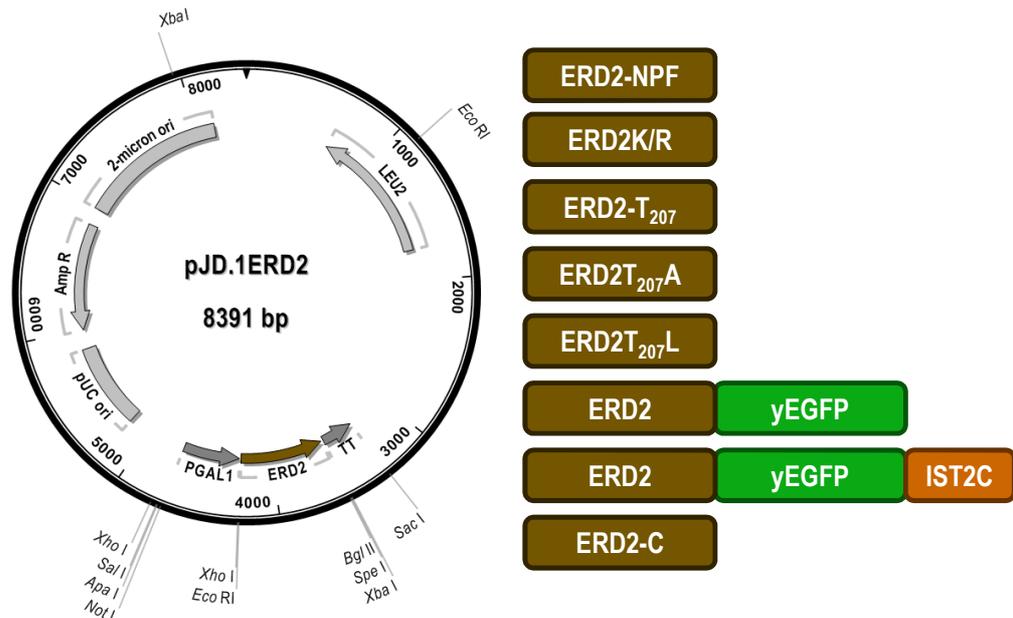


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der pJD.5-Derivate zur Expression der ERD2-Varianten.**

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Expressionsvektors pJD.5 und die schematische Darstellung aller in dieser Arbeit hergestellten und in pJD.5 klonierten ERD2-Varianten. Es sind die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angegeben, wie sie nach Klonierung in den Expressionsvektoren enthalten sind.

### 2.1.5 Expressionsvektoren: pJD.1-Derivate

Alle pJD.1-Derivate wurde durch Insertion eines *Apal SacI*-Fragments aus den entsprechenden pJD.5-Derivaten hergestellt. Dabei wurde der Promotor  $P_{Gal1}$ , die entsprechende *ERD2*-Variante und die *CYC1*-Terminatorsequenz eingefügt (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 5)



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der pJD.1-Derivate zur Expression der *ERD2*-Varianten.**

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Expressionsvektors pJD.1 und die schematische Darstellung aller in dieser Arbeit hergestellten und in pJD.1 klonierten *ERD2*-Varianten. Die Varianten wurden als *Apal SacI*-Fragments mit der  $P_{Gal1}$ -Promotor- und der *CYC1*-Terminatorsequenz aus den entsprechenden pJD.5-Vektoren inkloniert.

### 3. Oligonukleotide

**Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten Oligonukleotide und deren Verwendung.**

Die Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung aufgeführt. Start- und Stopp-Codons sind fett gedruckt, Schnittstellen sind in Klein- und kodierende Sequenzen in Großbuchstaben angegeben. Eingefügte Mutationen sind unterstrichen dargestellt. Rechts sind die Konstrukte aufgeführt, welche mit den entsprechenden Primern hergestellt wurden bzw. ihre Verwendung als Sequenzierungs- oder Kontrollprimer.

Primer	Sequenz	Verwendung
3' ANP1	tctagaGTTTCTATCAGGGTCGAAGTCTAA TGGAAC TTC	ANP1mCherry
3' CYC1 TT	gagctcGCAGCTTGCAAATTAAGCCTTCG AG	CYC1-Terminator
3' EGFP	agatctgtcgac <b>TTA</b> TTTGTACAATTCATC CATACCATGGGTAATACC	yEGFP
3' EGFP <sub>A206K</sub>	CGTTTGGATCTTTGGATAA <u>TT</u> TAGATTGAG TG	ERD2yEGFP <sub>A206K</sub>
3' EGFP <sub>IST2C</sub>	GAGTAGCATCTGTAGTAGTAGTAGTAGTAG TATTGTTATTAGATGGTCTgtcgacTTTGT ACAATTCATCCATACCATGGGTAATAC	ERD2YEGFP <sub>IST2C</sub>
3' ERD2	gtcgactctagaactagtagatct <b>TTA</b> TTT TGGCAGTTTGAAACCCTTTCCTCT	ERD2; ERD2-NPF; ERD2EGFP-Varianten
3' ERD2 Spel EGFP	CAACACCAGTGAATAATCTTCACCTTTAG <b>ACAT</b> actagtTTTTGGCAGTTTGAAACCCT TTCCTC	ERD2yEGFP <sub>A206K</sub> ; ERD2yEGFP <sub>IST2C</sub> ; ERD2-NPFyEGFP; ERD2-T <sub>207</sub> yEGFP
3' ERD2.147	actagttctagaCAAGTATCGTGTTATGAA AACC <sub>AA</sub> AGCGTAC	ERD2.2
3' ERD2.291	actagttctagaATCATGCATAAGCATTTT ATTATACGCAATG	ERD2.3
3' ERD2.363	actagttctagaAAAAGTGAACCTTGTGATG GAAAAAACACTCATTAG	ERD2.4
3' ERD2.462	actagttctagaAGTTAGACTTCTAGTCTT CCCACCCTTAGATAGC	ERD2.5
3' ERD2.546	actagttctagaTTTTTTATCTTCCGTGCT GTACCTCCAAATC	ERD2.6
3' ERD2.657	actagttctagaTTTTGGCAGTTTGAAACC CTTTCCTC	ERD2.7
3' ERD2+KTN	agatctgtcgac <b>TTA</b> AATTAGTTTTTTTTGG CAGTTTGAAACCCTTTCCTCT	ERD2+KTN
3' ERD2-C	agatctggatcc <b>TTA</b> GTAGTAAATGTAAAA GAAATCAGAGTACAACAGAGTTTGC	ERD2-C
3' ERD2EGFP	CAACACCAGTGAATAATCTTCACCTTTAG <b>ACAT</b> gtcgacTTTTGGCAGTTTGAAACCCT TTCCTC	ERD2yEGFP
3' ERD2K/R	agatctgtcgac <b>TTA</b> TCTTGGCAGTCTGAA ACCCCTTCTCTGATGACTCTAGTGTAGTA AATGTAAAAGAAATCAG	ERD2K/R

3' ERD2K/R EGFP	CAACACCAGTGAATAATTCTTCACCTTTAG ACATg <sup>tcgac</sup> T <sub>C</sub> TTGGCAGT <sub>C</sub> TGAAACCC <sub>C</sub> TTCCTCT	ERD2K/RyEGFP
3' ERD2-T <sub>207</sub>	tctagag <sup>tcgac</sup> actagtagatct <b>TTA</b> TTT TGGCAGTTTGAAACCCTTTCCTCTGATGAC TTGTAGTAAATGTAAAAG	ERD2-T <sub>207</sub>
3' ERD2T <sub>207A</sub>	ggatccagatct <b>TTA</b> TTTGGCAGTTTGAA ACCCTTTCCTCTGATGACTTTAGCGTAGTA AATGTAAAAG	ERD2T <sub>207A</sub>
3' ERD2T <sub>207L</sub>	ggatccagatct <b>TTA</b> TTTGGCAGTTTGAA ACCCTTTCCTCTGATGACTTTAAGTAGta aatgtaaaag	ERD2T <sub>207L</sub>
3' FLAG V5	CAACAATGGATTGGAATTGGTTTACCTTT ATCATCATCATCTTTATAATC	Reporter SUC2AV5
3' GAL1.1	AATCACCTAAGATTCTAAACGGATTCATga attcctc <sup>gag</sup> GGTTTTTCTCCTTGACGTT AAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTG TTGATACTTTTATTACATTGAATAAGAAG	P <sub>Gal1</sub> -Promotor
3' GAL1.2	tctagaACCTTCAATGTACCTTGTGGTCTT GATATTATGAATCAGGATCAGTATACTGGT TAGATGTGATAAATCACCTAAGATTCTAAA CGGATTCATgaattc	P <sub>Gal1</sub> -Promotor
3' GAL1.3	tctagaACCTTCAATGTACCTTGTGGTCTT GATATTATGAATCAGGATC	P <sub>Gal1</sub> -Promotor
3' IST2	ggatcc <b>TTA</b> aagcttCTTTTTCAGCTTATG C	ERD2yEGFP <sub>IST2C</sub>
3' mCherry	ggatccg <sup>tcgac</sup> <b>TTA</b> CTTGTACAGCTCGTC CATGCCG	mCherry
3' PMA1	actagtGGTTTCCTTTTCGTGTTGAGTAGA GACTC	PMA1mCherry
3' RAS	ggatcc <b>TTA</b> CTTGCAGCTCATGCAGCCG	Reporter RAS
3' ro2GFP	ggatcc <b>TTA</b> CTTGTACAGCTCGTCCATGCC GAG	Reporter ro2GFP
3' ro2GFP HDEL	ggatcc <b>TTA</b> tagctcatc <sup>g</sup> CTTGTACAG CTCGTCCATGCCGAG	SSro2GFP <sub>HDEL</sub>
3' SEC63	tctagaTTCTGGTGATTCATCATCTTCAGC TTCTG	SEC63mCherry
3' SEC63RAS	CACCACCACGCTTATATTCGGTCATTTTC TGGTGATTCATCATCTTCAGCTTCTG	SEC63RAS
3' SUC2A FLAG	GTTTACCTTTATCATCATCTTTATAAT CAGTGTAACCACCATCAAGAGAATAG	Reporter SUC2AV5
3' UBC4	gcgcgc <b>TTA</b> TACAGCGTATTTCTTTGTCCA TTCTCTG	MCUBC4
3' V5 c-MYC	ggatcc <b>TTA</b> CAAATCTTCTTCAGAAATCAA TTTTTGTTCAGTAGAATCCAAACCCAACAA TGGATTTGGAATTGGTTTAC	Reporter SUC2AV5
5' ANP1	ctcgagactagt <b>ATG</b> AAGTATAATAACAGA AAACTCTCGTTCAACCCTAC	ANP1mCherry
5' CYC1 TT	tctagag <sup>tcgac</sup> ggatccCATGTAATTAGT TATGTCACGCTTACATTCACGC	CYC1-Terminator

5' EGFP <sub>206K</sub>	CACTCAATCTAAATTATCCAAAGATCCAAACG	yEGFP <sub>206K</sub>
5' EGFP <sub>IST2C</sub>	GTATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACA AAgtcgacAGACCATCTAATAACAATACTA CTACTACTACTACTACAGATGCTACTC	ERD2yEGFP <sub>IST2C</sub>
5' ERD2	ctcgaggaattc <b>ATG</b> AATCCGTTTAGAATC TTAGGTGATTATCACAT	alle ERD2-Varianten mit wildtypischem N- Terminus
5' ERD2 Spel EGFP	GAGGAAAGGGTTTCAAACCTGCCAAAacta gt <b>ATG</b> TCTAAAGGTGAAGAATTATTCCTG GTGTTG	ERD2yEGFP <sub>206K</sub> ; ERD2yEGFP <sub>IST2C</sub> ; ERD2-NPFyEGFP; ERD2-T <sub>207</sub> yEGFP
5' ERD2EGFP	GAGGAAAGGGTTTCAAACCTGCCAAAgtcg ac <b>ATG</b> TCTAAAGGTGAAGAATTATTCCTG GTGTTG	ERD2yEGFP
5' ERD2K/R EGFP	AGAGGAAGGGTTTCAACTGCCAAAGgtc gac <b>ATG</b> TCTAAAGGTGAAGAATTATTCCT GGTGTG	ERD2K/RyEGFP
5' ERD2-NPF	ctcgaggaattc <b>ATG</b> GAGAATCTTAGGTGAT TTATCACATCTAACCCAG	ERD2-NPF; ERD2-NPFyEGFP
5' GAL1	gtcgacgcgcccgcACGGATTAGAAGCCGC CGAGC	P <sub>Gal1</sub> -Promotor
5' HA SUC2A	ACTAGTCCTAGGTATCCATATGATGTTCCA GATTATGCTGGTGCTTTCTCTGGCTCCATG	Reporter SUC2AV5
5' mCherry	ctcgagtctagaactagt <b>ATG</b> GTGAGCAAG GGCGAGGAG	mCherry
5' PMA1	ctcgag <b>ATG</b> ACTGATACATCATCCTCTTCA TCATCCTC	PMA1mCherry
5' RAS	actagt <b>ATG</b> ACGGAATATAAGCTGGTGGTG GTG	Reporter RAS
5' ro2GFP	actagt <b>ATG</b> GTGAGCAAGGGCGAGGAG	Reporter ro2GFP
5' SEC63	ctcgag <b>ATG</b> CCTACAAATTACGAGTATGAT GAGGCTAG	SEC63RAS; SEC63mCherry
5' SEC63RAS	CAGAAGCTGAAGATGATGAATCACCAGAAA <b>TG</b> ACGGAATATAAGCTGGTGGTGGTG	SEC63RAS
5' SS.I	ctcgaggaattc <b>ATG</b> TTTTTCAACAGACTA AGCGCTGGCAAGCTGCTGGTACCACTCTCC GTGGTCCTGTACGCCCTTTTCGTGGTAATA TTACC	SSro2GFP <sub>HDEL</sub>
5' SS.II ro2GFP	CTGTACGCCCTTTTCGTGGTAATATTACCT TTACAGAACTCTTTCCACTCCTCCAATGTT TTAGTTAGAGGTGCCGATGATATGGTGAGC AAGGGCGAGGAG	SSro2GFP <sub>HDEL</sub>
5' UBC4	gtcgac <b>ATG</b> TCTTCTTCTAAACGTATTGCT AAAGAACTAAGTG	MCUBC4
5' XhoI EcoRI ro2GFP	ctcgaggaattc <b>ATG</b> GTGAGCAAGGGCGAG GAG	ro2GFP für zytosolische Expression

## 4. Kultivierung

### 4.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium bei 37°C und 220 Upm in einem Schüttelinkubator (Multitron von Infors, Basel). LB-Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*

#### LB-Medium

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

Das Medium wurde autoklaviert.

Zur Herstellung von festem Medium wurden 1,5 % Agar zugegeben. Zur Selektion wurde das Medium mit Stammlösungen von Ampicillin oder Kanamycin supplementiert.

#### SOC-Medium

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

Das Medium wurde autoklaviert.

#### Antibiotika

##### Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	0,05	% (w/v)
EtOH	50	% (v/v)

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert. Ampicillin wurde zur Selektion von *E. coli* in LB-Medium in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

##### Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	0,05	% (w/v)
-----------	------	---------

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert. Kanamycin wurde zur Selektion von *E. coli* in LB-Medium in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

## 4.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht der temperatursensitiven *S. cerevisiae* Stämme in den aufgeführten Flüssigmedien erfolgte unter permissiven Bedingungen bei 20°C und unter nicht-permissiven Bedingungen bei 36°C auf dem Drehrad (Fröbel Labortechnik, Lindau). Die Kultivierung auf festem Medium erfolgte in Brutschränken bei entsprechenden Temperaturen.

Die Anzucht der übrigen *S. cerevisiae* Stämme in Flüssigmedien erfolgte bei 30°C und 220 rpm im Schüttelinkubator (Multitron von Infors, Basel). Die Kultivierung auf festem Medium erfolgte im Brutschrank bei 30°C.

### Komplexmedien zur Anzucht von Hefestämmen

#### YPD-Medium bzw. YPG-Medium

Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
Pepton	2,0	% (w/v)
Glukose bzw. Galaktose	20	mM

Das Medium wurde autoklaviert.

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

### Miminalmedien zur Anzucht von Hefestämmen

#### d/o-Medium

d/o-Mix	0,13	% (w/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	% (w/v)
Glukose bzw. Galaktose	2	% (w/v)

Die Lösung der Kohlenstoffquelle wurde getrennt von der Lösung mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und d/o Mix autoklaviert. Die YNB-Lösung wurde sterilfiltriert. Für die Herstellung von festem Medium wurden zusätzlich 1,5 % Agar zugegeben, der zusammen mit der Kohlenstoffquelle autoklaviert wurde.

d/o-Mix

Adenin	0,25	g
Aspartat	0,6	g
Glutamat	0,6	g
Histidin HCl Monohydrat	0,12	g
Lysin Monohydrat	0,18	g
Methionin	0,12	g
Phenylalanin	0,3	g
Serin	2,25	g
Threonin	1,2	g
Tryptophan	0,24	g
Tyrosin	0,18	g
Valin	0,9	g

Zur Herstellung von 1 l eines entsprechenden d/o-Mediums wurden 1,3 g d/o Mix eingesetzt und mit Zugabe von 10 ml einer Uracil-Stammlösung (2 mg/ml), 6 ml einer Leucin-Stammlösung (10 mg/ml) oder 2 ml einer Arginin-Stammlösung (10 mg/ml) komplettiert. Zur Expression von *CAN1*-Konstrukten in *S. cerevisiae* wurde 1 l Medium mit 0,2 ml der Arginin-Stammlösung komplettiert.

5-FOA d/o-Medium

5-Fluororotsäure	0,1	% (w/v)
2x d/o Agar	50	% (w/v)

Zur Herstellung von 5-FOA-Agar wurde entsprechendes d/o Medium in doppelter Konzentration hergestellt und mit sterilfiltrierter 0,2 %iger 5-FOA-Stammlösung im Verhältnis 1:1 gemischt, so dass eine 5-FOA-Endkonzentration von 0,1% erreicht wurde.

### 4.3 Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Mikroorganismen wurden Dauerkulturen in Form von Glycerin-Suspensionen erstellt. Eine frische Übernacht-Kultur wurde im Verhältnis 1:1 mit 99%igem sterilem Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen (Nalgene, über Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5. Zellzahlbestimmung

### 5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl von *S. cerevisiae* Kulturen wurde mit Hilfe einer Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm (Neubauer improved von Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) durchgeführt.

## 5.2 Bestimmung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte einer Kultur wurde durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm an einem Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences Freiburg) bestimmt. Die Schichtdicke der verwendeten Küvetten betrug 1 cm. Als Referenz diente das entsprechende unbeimpfte Medium.

## 6. Transformationsmethoden

### 6.1 Elektroporation von *E. coli*

Die Elektroporation stellt eine hocheffektive Methode dar, Plasmid-DNA in pro- und eukaryotische Zellen einzubringen. Diese Transformation beruht auf dem Effekt, dass mit Hilfe eines Kondensators durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die Bildung von Poren in der Zellmembran elektrokompetenter Zellen induziert werden kann. Durch diese Poren können im Umgebungsmedium vorhandene Makromoleküle von den Zellen aufgenommen werden (Calvin und Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988). Über Elektroporation werden im Vergleich zu chemischen Transformationsmethoden deutlich höhere Transformationsraten erreicht.

Elektrokompetente *E. coli* Zellen des Stammes TOP10 wurden nach folgender Methode hergestellt: 300 ml LB-Medium wurden 1 %ig mit einer frischen TOP10-Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 220 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Kultur 5 Minuten bei 4°C und 8.000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit sterilem 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 8.000 Upm wurde das Pellet aus elektrokompetenten Zellen in gleichem Volumen 10 %igem Glycerin resuspendiert, zu 40 µl (ca. 10<sup>10</sup> Zellen) aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Um bei der Elektroporation eine Spannungsentladung im Ansatz zu vermeiden, muss sowohl die eingesetzte Bakteriensuspension als auch die

DNA-Lösung frei von Salzen sein. Daher wurden die zu transformierenden Ligationsansätze 60 min auf einer Nitrocellulosemembran (Millipore, Eschborn) gegen 10 %iges Glycerin dialysiert. 40 µl der elektrokompetenten TOP10-Zellen wurden mit 5 µl des dialysierten Ligationsansatzes in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette bei 200 Ω, 2,5 kV/cm und 25 µF elektroporiert. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert und danach auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum-Zusatz ausplattiert.

## 6.2 Lithium-Acetat-Transformation von *S. cerevisiae*

Die natürliche Fähigkeit von Hefezellen, DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen, kann durch die Zugabe von alkalischen Kationen und hochmolekularer chromosomaler DNA gesteigert werden (Ito *et al.*, 1983; Schiestl und Gietz, 1989). Auf diese Weise wurden in Hefezellen gezielt rekombinante Plasmid-DNA oder „knock-out“-Kassetten aus linearer doppelsträngiger DNA eingebracht.

Bei der Transformation wurde das Zellpellet aus 1 ml Übernacht-Kultur in 500 µl LiAc/TE-Lösung gewaschen und in 100 µl LiAc/TE-Lösung resuspendiert. Zu 100 µl Zellsuspension wurden 10 µl hitzedenaturierter Carrier-DNA-Stammlösung (10 mg/ml DNA aus Heringspermien), 2 µl Plasmid, 3 µl 10x LiAc-Lösung und 600 µl PEG-Lösung gegeben und 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach 15-minütigem Hitzeschock bei 42°C im Heizblock wurden die Zellen bei 13.000 Upm 1 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 1x TE-Lösung gewaschen und in 500 µl 1x TE-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurden auf entsprechendem d/o Selektions-Agar ausplattiert und drei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert.

### 10x TE-Puffer

Tris-HCl	100	mM
EDTA	10	mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.  
Der Puffer wurde autoklaviert.

10x Lithiumacetat-Lösung

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

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt.

PEG-Stammlösung

PEG 4000	50	% (w/v)
----------	----	---------

Die Lösung wurde autoklaviert.

LiAc/TE-Lösung

10x TE-Puffer	1	Teil
10x Lithiumacetat-Lösung	1	Teil
H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	8	Teile

PEG-Lösung

10x TE-Puffer	1	Teil
10x Lithiumacetat-Lösung	1	Teil
PEG-Stammlösung	8	Teile

## **7. Methoden zur DNA-Isolierung**

### **7.1 Alkalische Lyse**

Die alkalische Lyse ist eine einfache und schnelle Methode, Plasmid-DNA aus Bakterien zu gewinnen. Bei Zugabe der GTE-Lösung werden zweiwertige Metallkationen durch EDTA komplexiert und somit die Membran destabilisiert. Das anionische Detergenz SDS denaturiert die zellulären Proteine und die Erhöhung des pH-Werts durch NaOH führt zum Ausfallen der chromosomalen DNA und der Plasmide. Nach Zugabe neutralisierender Kaliumacetat-Lösung kann die Plasmid-DNA im Gegensatz zur chromosomalen renaturieren. Nach Zentrifugation verbleibt die doppelsträngige Plasmid-DNA in Lösung und kann in einem späteren Schritt mit Hilfe von Ethanol gefällt werden. Verunreinigungen durch RNA können durch Zugabe von RNase abgebaut werden. Die Durchführung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979).

Die Zellen aus 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 20 Sekunden bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge pelletiert und in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung wurde durch Invertieren gemischt und 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Lösung klar erschien. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 150 µl

Kaliumacetat-Lösung (pH-Wert 4,8) und die Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA wurde 5 Minuten auf Eis durchgeführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10.000 Upm wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 800 µl 95 %igem Ethanol 5 min auf Eis gefällt und 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet aus Plasmid-DNA wurde in 20 µl sterilem Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### GTE-Lösung

Glukose	50	mM
Tris-HCl	25	mM
Na <sub>2</sub> EDTA	10	mM

Die Lösung wurde autoklaviert.

#### NaOH/SDS-Lösung

NaOH	0,2	M
SDS	1	% (w/v)

#### Kaliumacetat-Lösung

Für die Herstellung von 100 ml Kaliumacetatlösung wurden KOH-Plätzchen zu 29,5 ml Eisessig bis zum Erreichen eines pH-Werts von 4,8 zugegeben und die Lösung mit Aq<sub>dest</sub>-Zugabe auf 100 ml gebracht.

## **7.2 innuPREP Plasmid Mini Kit**

Das innuPREP Kit Plasmid Mini Kit (analytikjena, Jena) erlaubt die schnelle Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit darauf folgender Bindung der DNA an das Filtermaterial einer Zentrifugationssäule. Die DNA wird durch Waschschriffe gereinigt und kann über einen Niedrig-Salz-Puffer oder steriles Wasser vom Filtermaterial eluiert werden. Die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 7.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktion und Auftrennung im Agarosegel wurde das „E.Z.N.A. Gel Extraction (Q-spin) Kit“ von Omega biotek (Norcross, Georgia) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses System ist optimiert für die Aufreinigung von DNA einer Größe von 50 bp bis 40 kbp. Es wird die reversible Bindung der DNA an die HiBind®-Matrix einer Zentrifugationssäule genutzt. Die gereinigte DNA ist frei von Ethidiumbromid, Agarose, Proteinen und Salzen und kann für Ligationen, PCR, Sequenzierung, Restriktionsverdau und Labeling-Reaktionen eingesetzt werden.

### 7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurden Hefezellen aus 2 ml einer Übernachtskultur 3 min bei 11.000 Upm pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 1,5 ml sterilem Wasser wurde das Pellet in 40 µl „Breaking“-Puffer resuspendiert und 0,06 g Zirkonia/Silica Beads (Carl Roth, Karlsruhe) und 40 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol zugegeben. Nach 3-minütigem Vortexen wurde die Suspension mit 40 µl 1xTE-Lösung versetzt und kurz gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12.500 Upm wurde die obere wässrige Phase in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 ml 99 %igem Ethanol wurde die chromosomale DNA bei 20°C mindestens 2 h gefällt und bei 4°C und 14.000 Upm drei Minuten abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl sterilem Wasser aufgenommen, bei -20°C gelagert und als „template“-DNA zur PCR eingesetzt.

#### „Breaking“-Puffer

Triton X-100	2	% (v/v)
SDS	1	% (w/v)
NaCl	100	mM
Tris-HCl	10	mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1	mM

### 10x TE-Puffer

Tris-HCl	100	mM
EDTA	10	mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.  
Der Puffer wurde autoklaviert.

## **7.5 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit**

Die spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen nutzt die unterschiedlichen Absorptionsspektren von DNA und Proteinen aus. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Um die Konzentration von Proteinen zu bestimmen, wird die charakteristische Absorption aromatischer Aminosäuren bei 280 nm vermessen. Bei einer Verunreinigung durch Proteine liegt der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  unter einem Wert von 1,8.

Die Absorptionsmessungen wurden am Spektralphotometer „Gene Quant“ des Herstellers Pharmacia durchgeführt. Es wurden 1:60-Verdünnungen der DNA-Proben in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm vermessen. Das verwendete Gerät berechnet das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$  und die DNA-Konzentration der Probe.

## **8. Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (kurz: PCR, „polymerase chain reaction“) ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Es werden kurze einzelsträngige Oligonukleotide eingesetzt, die spezifisch innerhalb der beiden Endbereiche der zu amplifizierenden Sequenz an die „template“-DNA binden. Dort bilden sie einen kurzen doppelsträngigen Bereich aus, an den die DNA-Polymerase binden kann, um den komplementären Strang an der eingesetzten Matrize zu synthetisieren. Eine PCR wird in aufeinanderfolgenden Zyklen aus drei Schritten durchgeführt: Im ersten Schritt wird der Ansatz aus eingesetztem DNA-„template“, Oligonukleotid-Primern, der thermostabilen Polymerase, Desoxyribonukleotiden und  $MgCl_2$  auf 95°C erhitzt. Dabei erfolgt die Denaturierung der eingesetzten „template“-DNA durch Aufschmelzen beider Stränge, so dass im „Annealing“-Schritt bei sequenzspezifischer

Temperatur die beiden Primer an die einzelsträngigen Enden des zu vervielfältigenden Bereichs binden können. Bei der Elongation werden durch die Syntheseaktivität der Polymerase Nukleotide komplementär zum Matrizenstrang an die Primer-3'-Enden anfügt. Die Wiederholung dieser Zyklen erzielt eine exponentielle Vermehrung des eingesetzten DNA-Fragments.

Einen speziellen Ansatz der PCR stellt die SOE-PCR („splicing by overlapping extension“) dar. Dabei können zwei DNA-Fragmente über einen gemeinsamen Sequenzbereich verbunden werden, ohne dass Restriktions- und Ligationsschritte notwendig werden. Mit dieser Technik kann z.B. innerhalb eines Gens ein Teilbereich deletiert werden oder es können zwei Gensequenzen zu einem Fusionskonstrukt verbunden werden. In einer ersten Reaktion wird der vordere Teil des Fusionsgens über entsprechende Primer so amplifiziert, dass er in einer ca. 30 bp langen Sequenz endet, die dem 5'-Anfang des hinteren Teils entspricht. Analog dazu wird der hintere Teil des Fusionsgens mit dem 3'-Ende des vorderen Teils versehen. Werden nun beide Amplifikate in einer Reaktion vereint, können sich die angefügten Enden der Teilbereiche aneinander anlagern und so selbst als Primerbereiche fungieren.

Bei Sequenzen unter 1500 bp wurde die Taq-Polymerase der Firma 5Prime (Hamburg) eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit mehr als 1500 bp wurde eine Taq-DNA-Polymerase mit Zusatz eines „proofreading“-Enzyms mit einer im Vergleich zu herkömmlicher Taq-Polymerase um den Faktor vier niedrigeren Fehlerrate von  $8,5 \times 10^{-6}$  (Roche, Mannheim) verwendet. In allen Reaktionen wurden die spezifischen Primer in der Konzentration 1  $\mu$ M eingesetzt, 0,2 mM dNTPs, 4 ng/ $\mu$ l „template“-DNA und 0,05 U/ $\mu$ l der jeweiligen DNA-Polymerase.

Eine Standard-Reaktion verlief nach folgendem Schema:

Denaturierung	94°C	4 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
„Annealing“	54°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
terminaler Elongationsschritt	72°C	7 min	
Lagerung	4°C	∞	

Die exakten Temperaturen und Zeitspannen der einzelnen Schritte wurden für die jeweiligen Sequenzen optimiert. Es kamen die Thermocycler „Primus 96 plus“ (MWG-Biotech, Ebersberg) und *eppgradient S* (Eppendorf, Hamburg) zum Einsatz. Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

## 9. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine schnelle und kostengünstige Methode, DNA-Moleküle für analytische und präparative Zwecke nach ihrer Größe zu trennen. Dabei wird an eine Gelmatrix, deren Porengröße von der Konzentration des Zuckerpolymers Agarose abhängt, eine Spannung angelegt. Die negative Ladung der Phosphatgruppen bedingt eine Bewegung der DNA-Fragmente zur Anode hin. Dabei nimmt die Geschwindigkeit mit zunehmender Größe der DNA-Moleküle logarithmisch ab. Anhand eines mitgeführten Markers, der ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe und Konzentration enthält, kann die Größe der getesteten Fragmente bestimmt und die Konzentration abgeschätzt werden. Der Nachweis kann optisch über den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Belichtung erbracht werden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in 1 %igen Agarosegelen mit 1x TBE-Puffer. Die Spannung betrug 8 V/cm. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an „Gel-loading buffer“ (GLB) versetzt. Als Größenstandard wurden 5 µl „SmartLadder“ der Firma Eurogentec eingesetzt (vgl. Abbildung 10). Die Agarosegele wurden 15 min in wässriger Ethidiumbromidlösung (0,5 ‰) gefärbt und die Fluoreszenzsignale

über das „Molecular Imager Gel Doc XR“ System (Biorad, München) dokumentiert.

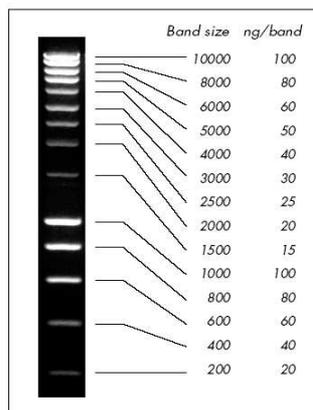
10x TBE-Puffer

Tris-HCl	0,89	M
Borsäure	0,89	M
Na <sub>2</sub> EDTA	20	mM

Der Puffer wurde autoklaviert.

GLB („gel loading buffer“)

Glyzerin	50	% (v/v)
SDS	1	% (w/v)
Na <sub>2</sub> EDTA	125	mM
Bromphenolblau	0,05	% (w/v)
Xylencyanol	0,05	% (w/v)



**Abbildung 10: Laufmuster, Größen und Konzentrationen des DNA-Größenstandards „SmartLadder“ (Eurogentec, Köln).**

- links: Markerbanden-Muster im Agarosegel
- Mitte: Größe der Markerbanden in bp
- rechts: Konzentration der Markerbanden

**10. DNA-Restriktion**

Mit Restriktionsendonukleasen der Klasse II kann doppelsträngige DNA an spezifischen, meist palindromischen Erkennungssequenzen enzymatisch geschnitten werden. Je nach gewähltem Enzym besteht die Erkennungs- und Schnittstelle aus vier bis sechs Nukleotiden und es entstehen durch die Spaltung der Phosphodiester-Bindung entweder überhängende Einzelstrangenden, sogenannte „sticky ends“, oder glatte Doppelstrangenden, sogenannte „blunt ends“.

Für eine Restriktionsanalyse wurden 0,5 – 1 µg der Plasmid-DNA und 5 U des entsprechenden Restriktionsenzym in einem Ansatz von 20 bis 30 µl eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers Fermentas (St. Leon-Rot) wurden entsprechende Reaktionspuffer ([www.fermentas.com/doubledigest/index.html](http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html)) und 5 U DNase-freier RNase zugegeben. Nach 1 – 2 h Reaktionszeit bei 37°C wurde der Restriktionsansatz mit 1/5 des Volumens an GLB versetzt und im 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

## 11. DNA-Ligation

DNA-Ligasen katalysieren unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung der Enden zweier linearisierter DNA-Moleküle durch Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer 3'-Hydroxy-Gruppe. Diese Funktion wird beim Klonieren eines Restriktionsfragments in den gewünschten Vektor genutzt. Nach komplementärer Basenpaarung der überstehenden Enden entsteht hierbei ein kovalent geschlossenes DNA-Ringmolekül.

In der vorliegenden Arbeit wurde das T4-Ligase-System der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet. Das molekulare Verhältnis von linearisiertem Vektor und Insert betrug meist 1:3, musste bei einigen Ligationen aber angepasst werden. Die Ligationsreaktion wurde vor der Elektroporation in *E. coli*-Zellen hitzeinaktiviert und gegen 10 %iges Glycerin dialysiert. Die Überprüfung auf erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktionsanalyse an aus Liganden isolierter Plasmid-DNA durchgeführt.

## 12. TOPO- und Acceptor-Klonierung von PCR-Amplifikaten

### 12.1 pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit

Bei der TOPO-Klonierung wird ausgenutzt, dass die Taq-Polymerase am 3'-Ende jedes amplifizierten Fragments ein zusätzliches Adenosin anfügt. Der linearisierte TOPO-Vektor besitzt die dazu komplementären 3'-Thymidin-Überhänge, die ein Einfügen eines PCR-Fragments erlauben. Die Integration eines PCR-Amplifikats wird im verwendeten System über die Topoisomerase I des Vaccinia-Virus ermöglicht, welche kovalent über ihren Tyr-274-Rest an die 5'-Phosphatreste der Vektorüberhänge gebunden ist. Bei der Ligation von einem PCR-Amplifikat in den Vektor wird die Topoisomerase verdrängt. Die Insertionsrichtung ist dabei zufällig und kann mit Restriktionsanalysen überprüft werden.

Die genaue Vorgehensweise erfolgte gemäß dem Klonierungsprotokoll für den Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO der Firma Invitrogen (Manual Version J, Catalog no. K4150-01) mit anschließender Transformation der im Expression Kit enthaltenen chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen. Mit Hilfe der Primer GAL1for und V5rev kann das integrierte PCR-Produkt im Vektor pYES sequenziert werden.

### 12.2 AccepTor™-Cloning

Als alternativer Zwischenklonierungsvektor wurde das pSTBlue-1 AccepTor™ Vector Giga Kit von Novagen (Darmstadt) laut Herstellerangaben verwendet. Der linearisierte AccepTor-Vektor enthält einzelsträngige 3' dU-Überhänge, mit denen in einer direkten Ligationsreaktion die 3' dA-Überhänge von PCR-Produkten nach Amplifikation mit einer Taq-Polymerase verknüpft werden können. Die Transformation erfolgt in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen „NovaBlue Singles™“. Das Klonierungssystem bietet die Möglichkeit für ein Blau-Weiß-„Screening“. Zur Sequenzierung der Inserts in pSTBlue1 wurden die Primer T7 und SP6 eingesetzt.

## Reagenzien für Blau-Weiß-Screening

### X-GAL-Stammlösung

X-Gal 20 mg/ml

in N,N-Dimethylformamid

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert. Zum Blau-Weiß-Screening wurden 35 µl X-Gal-Stammlösung auf einer LB-Agar- ausplattiert.

### IPTG-Stammlösung

IPTG 100 mM

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert. Zum Blau-Weiß-Screening wurden 20 µl IPTG-Stammlösung auf einer LB-Agar- ausplattiert.

## 13. DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der Konstrukte auf korrekte DNA-Sequenz wurden alle Plasmide aus Zwischenklonierungen sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion nach der Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977) und die Kapillar-Elektrophorese wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

Die Sequenzauswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Seqman“ aus dem „DNA-Star“-Software-Paket durchgeführt.

## 14. Zellaufschluss-Methoden

### Gewinnung von Ganzzelllysat durch Glasperlen-Zellaufschluss

Bei dieser Zellaufschlussmethode wird die rigide Zellwand der Hefezellen durch die Scherkräfte aufgebrochen, die beim Vortexen der Zellen mit Glasperlen entstehen. Die Zugabe von EDTA und DTT erleichtert die Lösung von Proteinkomplexen, Proteaseinhibitoren verhindern den Abbau der zellulären Proteine.

Hefekulturen wurden unter induzierenden Bedingungen bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 1-5 angezogen und bei 4°C und 8000 Upm geerntet. Pro Gramm Nassgewicht des Zellpellets wurde mit 4 ml H<sub>2</sub>O steril gewaschen. Der Waschschritt wurde einmal wiederholt. Die Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 4 ml eiskaltem Disruptionspuffer pro Gramm Nassgewicht resuspendiert. Nach Zugabe von 4 g Glasperlen (Zirkonia/Silica „beads“, Roth, Karlsruhe) pro Gramm Zellen wurde der Ansatz 1 min auf Stufe 8 gevortext

gefolgt von einem 1-minütigen Kühlungsschritt auf Eis. Abwechselndes Vortexen und Kühlen wurde dreimal wiederholt. Das Ganzzelllysat wurde abpipettiert, ohne Glasperlen mitzuführen. Die Proteine des Ganzzelllysats wurden durch Aceton-Fällung aufkonzentriert und über SDS-PAGE und Western-Analyse untersucht.

#### Disruptionspuffer

Tris	20	mM
MgCl <sub>2</sub>	10	mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1	mM
Glyzerin	5	% (v/v)
DTT	1	mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,3	M

Die Lösung wurde bei Gebrauch frisch mit einer Proteaseinhibitor-Stammlösung versetzt.

#### 25x Proteaseinhibitor-Stammlösung

Eine Tablette „protease inhibitor cocktail with EDTA“ (Roche, Mannheim) wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>steril</sub> gelöst. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### Schnellaufschluss von Hefezellen nach Gardner *et al.* (1998)

In dieser Arbeit wurde ein alternatives Zellaufschluss-Protokoll verwendet, mit Hilfe dessen Hefezellen durch Detergenzien und Galsperlen aufgeschlossen werden und das Ganzzelllysat direkt in Probenpuffer vorliegt. Die Methode wurde modifiziert nach Gardner *et al.* (1998) durchgeführt. Die Hefezellen aus 10 ml einer ÜN-Kultur wurden geerntet, einmal mit sterilem Wasser gewaschen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200 µl SUMEB-Puffer, 20 µl einer Protaseinhibitor-Stammlösung und 0,3 g Glasperlen zugegeben. Die Proben wurden dreimal 60 sec bei höchster Geschwindigkeit gevortext. Zwischen den Aufschlussschritten wurden die Proben 2 min auf Eis gekühlt. Nachfolgend wurde das Ganzzelllysat 15 min bei 70°C im Wasserbad erhitzt, um die Proteine zu solubilisieren. Das Lysat wurde von den Glasperlen abpipettiert und konnte sofort zur SDS-PAGE eingesetzt werden.

SUMEB-Puffer

SDS		1	% (w/v)
Harnstoff		8	M
MOPS	pH 6,8	10	mM
EDTA		10	mM
Bromphenolblau		0,01	% (w/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,3	M

Der Puffer wurde ohne MOPS hergestellt, autoklaviert und anschließend mit einer sterilfiltrierten MOPS-Stammlösung komplettiert.

**15. Proteinbiochemische Methoden**

**15.1 Proteinfällung mit Aceton**

Um Proteine aus Lösungen aufzukonzentrieren wurde eine Acetonfällung durchgeführt. Ein Teil einer wässrigen Probe wurde dabei mit vier Teilen eiskaltem Aceton versetzt, gemischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt. Die gefällten Proteine wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 Upm 20 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in einem möglichst geringen Volumen an mit Proteaseinhibitor versetztem Wasser und SDS-Probenpuffer gelöst.

**15.2 SDS-PAGE**

Die erstmals von Shapiro *et al.* (1967) beschriebene SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Ein Proteingemisch wird in einem Puffer mit dem anionischen Detergens SDS gelöst. Dabei werden nichtkovalente Wechselwirkungen aufgebrochen und die Proteine denaturiert. Es entstehen Protein-SDS-Komplexe, die ein konstantes Ladungs-/Masse-Verhältnis aufweisen und durch die negative Ladung im elektrischen Feld wandern. Das Proteingemisch wird in einem vertikalen Gel aus einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Gels aus unterschiedlichen Konzentrationen von Acrylamid und quervernetzendem Bisacrylamid bestimmt dabei die Porengröße. Der Start der Polymerisationsreaktion erfolgt durch die Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat, TEMED kommt eine katalytische Funktion zu. Zum

Größenvergleich wird ein Größenstandard - ein Gemisch aus Proteinen bekannten Molekulargewichts - mit aufgetragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 %ige Tris/Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem eingesetzt (Schägger und von Jagow, 1987). Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurden diskontinuierliche Gele verwendet. In der Sammelgelmatrix erfolgt eine Konzentrierung des Proteingemischs, das im folgenden engporigen Trenngel in die einzelnen Proteine aufgetrennt wird.

Die Zusammensetzung der Gele ist im Folgenden aufgeführt:

#### Trenngele

Rotiphoresegel 30		5,88	ml
TrisHCl/SDS		5,0	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>		2,12	ml
Glyzerin	79%	2	ml
TEMED		25	µl
APS	10%	80	µl

Die Angaben gelten für 2 Gele der Größe 10 cm mal 8,2 cm und 1 mm Dicke.

#### Sammelgele

Rotiphoresegel 30		1,62	ml
TrisHCl/SDS		3,1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>		7,78	ml
TEMED		25	µl
APS	10%	80	µl

Die Angaben gelten für 2 Gele.

Als Größenstandard wurden in eine Spur 7 µl „page ruler prestained“ von Fermentas aufgetragen (vgl. Abbildung 11). Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100°C denaturiert. Proben mit Membranproteinen wurden 15 min bei 60°C denaturiert, um die Bildung von Aggregaten zu vermeiden. Die Elektrophorese erfolgte im Elektrophoresesystem „Mini-Protean II“ von BioRad bei 80 - 120 V. Der Proteinnachweis wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran im Western Blot-Verfahren erbracht.

2x SDS-Probenpuffer

SDS	4	% (w/v)
EDTA	4	mM
Glyzerin	20	% (v/v)
Bromphenolblau	0,01	% (w/v)

in 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH6,8

reduzierender Probenpuffer enthält zusätzlich 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol

Tris-HCl/SDS-Puffer

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

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl auf 8,45 eingestellt.

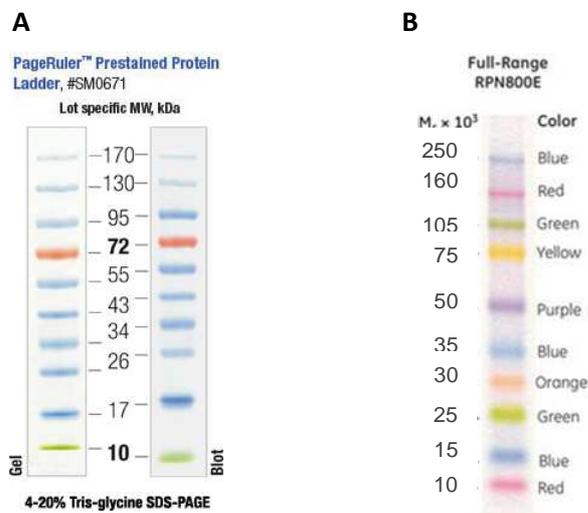
5x Anodenpuffer

Tris-HCl	1	M
----------	---	---

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl auf 8,9 eingestellt.

5x Kathodenpuffer

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



**Abbildung 11: Laufmuster und Größen der verwendeten Protein-Größenstandards.**

(A) „page ruler prestained protein ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot)

(B) „full range rainbow molecular weight marker“ (Amersham Life Science, GE Healthcare, Freiburg)

### 15.3 Western-Analyse

Als Western Blot wird eine immunologische Nachweismethode für Proteine bezeichnet, die sich einer Elektrophorese anschließt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden dabei aus der Gelmatrix mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen, auf welcher der spezifische Nachweis von Proteinbanden über Antikörper durchgeführt wird (Gershony und Palade, 1983).

#### „Semi-dry blotting“

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine im „Semi-dry-blotting“-Verfahren in einer „Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell“-Apparatur von BioRad auf eine PVDF-Membran (Roche, Mannheim) fixiert. Dazu wurde zunächst die PVDF-Membran in Methanol getränkt und in Transferpuffer äquilibriert. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden in Transferpuffer von Salzen und Detergenzien befreit. Gel und Membran wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt und zwischen Transferpuffer-getränkten Whatman-Papierschichten in die horizontale Blotting-Apparatur eingespannt. Bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

#### Transferpuffer

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

#### Immunodetektion

Bei der Immunodetektion von Proteinen auf Membranen wird die spezifische Bindung von Antikörpern an Antigene genutzt. Mono- oder polyklonale Antikörper binden an das nachzuweisende Protein auf der PVDF-Membran. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, der meist über eine gekoppelte Enzymfunktion eine Farb- oder Lumineszenzreaktion auslöst, welche optisch detektiert werden kann.

Um im nachfolgenden immunologischen Nachweis unspezifische Protein-Antikörper-Bindungen zu minimieren, wurde die PVDF-Membran über Nacht in Blockingpuffer abgesättigt. Die Hybridisierungszeiten für den primären und den sekundären Antikörper betragen 1 h. Die primären Antikörper wurden entsprechend Herstellerangaben in Blockingpuffer verdünnt (vgl. Tabelle 7). Vor Zugabe des Sekundär-Antikörpers wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Als Sekundär-Antikörper kam der polyklonale anti-Maus-Antikörper „ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugated“ des Herstellers Thermo Scientific (Rockford, USA) zum Einsatz. Die kovalent an die Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase ermöglichte die Nachweisreaktion über Chemolumineszenz unter Verwendung des „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“-Kits (Thermo Scientific). Die Membran wurde vor der Zugabe der Entwicklungslösung viermal mit Waschpuffer gewaschen.

Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte am „Molecular Imager“ ChemiDoc XRS (BIO RAD, München) oder auf Fotofilmen (Roche, Mannheim) über Nacht bei 20°C. Die Filme wurden mit den Lösungen „Roentogen Liquid“, 2%iger Essigsäure und „Roentogen Superfix“ entwickelt (Tetenal, Norderstedt).

**Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Antikörper, deren Eigenschaften und Herkunft.**

Antikörper	Klon	Herkunft	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
anti-c-Myc	9E10, monoklonal	murin	IgG1	1 µg/ml	Roche
anti-FLAG M2	M2, monoklonal	murin	IgG1	1:10.000	Sigma
anti-GFP	Mischung 7.1 und 13.1, beide monoklonal	murin	IgG1	0,4 µg/ml	Roche
anti-HA	12CA5, monoklonal	murin	IgG2b	0,1 µg/ml	Roche
anti-V5	SV5-Pk1, monoklonal	murin	IgG2a	1:1.000	AbD Serotec

10x TBS

Tris-HCl	1	M
NaCl	1	M

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

Waschpuffer

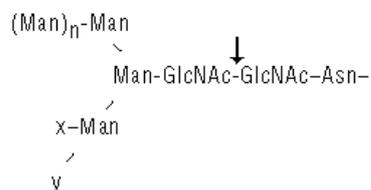
Tween 20 in 1x TBS	0,05	% (v/v)
-----------------------	------	---------

Blockingpuffer

Magermilchpulver in Waschpuffer	5	% (w/v)
------------------------------------	---	---------

### 15.4 Deglykosylierung mit EndoH

Die erstmals aus *Streptomyces plicatus* isolierte Glukosidase Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (EndoH) spaltet spezifisch die mannosereichen Glykosylreste von Proteinen zwischen der ersten und der zweiten N-Acetylglucosamin-Einheit der „core“-Glykosylierung (Maley *et al.*, 1989; vgl. Abbildung 12). In dieser Arbeit wurde das rekombinante Enzym EndoH (NEB, Frankfurt) nach Herstellangaben verwendet, um in „mobility shift“-Analysen Aufschluss über den Glykosylierungszustand von Fusionsproteinen zu erhalten. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurden die deglykosylierten Proben mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und über SDS-PAGE und Western-Analyse weiterbearbeitet.



**Abbildung 12: Erkennungs- und Schnittstelle für Endoglykosidase EndoH (NEB, Frankfurt).**

Endoglykosidase H ist eine rekombinante Glykosidase, die nur im Chitobiose-Kern von Oligosacchariden des „high mannose“-Typs ( $n = 2-150$ ,  $x = (\text{Man})_{1-2}$ ,  $y = \text{H}$ ) und einiger Hybrid-Oligosaccharide ( $n = 2$ ,  $x$  and/or  $y = \text{AcNeu-Gal-GlcNAc}$ ) von N-Glykosylierungen schneidet.

## 16. Fluoreszenzmikroskopische Methoden

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Sie beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz – einer Form von Lumineszenz, bei der von organischen oder anorganischen Verbindungen nach Anregung ein sehr kurzes Nachleuchten im Bereich von millionstel Sekunden ausgesendet wird. Diese optische Strahlung lässt sich durch Energieübergänge in den fluoreszierenden physikalischen Systemen, den Fluorophoren erklären. Wird ein Fluorophor mit Licht der entsprechenden Anregungswellenlänge bestrahlt, werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Unter Energieverlust fallen sie auf das ursprüngliche Niveau zurück und es wird Emissionslicht ausgesendet. Die Wellenlänge der Emission ist dabei immer geringer als die Anregungswellenlänge, dieses Phänomen bezeichnet man als Stokes-Shift.

Wird die Fluoreszenz in einem Objekt bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie mit einer Quecksilberlampe angeregt, erfolgt die Beleuchtung über das ganze Objekt. Die konfokale Mikroskopie bietet den Vorteil, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende schließt Licht, das von außerhalb der Fokusebene stammt aus, so dass nur Signale aus dieser Ebene vom Detektor, einer Photomultiplier-Einheit, erfasst werden können. Beim Laser Scanning Mikroskop wird die Probe durch einen Laserstrahl in einer x-y-Ebene Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert und das Bild aus dieser Datenmenge zusammengesetzt. Durch schrittweises Verschieben der Fokusebene in z-Richtung können optische Schnitte einer Probe erzeugt werden, die nach digitaler Verarbeitung das Objekt in Form eines dreidimensionalen Bildstapels wiedergeben. Mit diesem Ansatz wird eine bessere räumliche Auflösung und ein deutlich geringerer Verlust an Fluoreszenzausbeute durch Ausbleichen erreicht als bei der klassischen Fluoreszenzmikroskopie. In dieser Arbeit wurden alle Aufnahmen mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) durch ein 100x Objektiv (Zeiss, numerische Apertur 1,3) mit Ölimmersion angefertigt.

Bei der Multiphotonen-Anregung wird die notwendige Energie, die Elektronen auf höhere Energieniveaus anzuheben, von mehreren Photonen geliefert, die gleichzeitig auf die Probe gelenkt werden und deren Wellenlängen sich aufaddieren. Dieses System zeichnet sich durch eine deutlich schonendere Behandlung der Proben aus, da das Anregungsvolumen sehr eng begrenzt ist. Zusätzlich ermöglicht diese Technik die Analyse von Zellen in Gewebeverbänden, da längerwelliges Laserlicht eine höhere Eindringtiefe in biologische Proben aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zweiphotonenmikroskopie über ein „Chameleon“-Laser-System des Herstellers Coherent (Glasgow, UK) angewandt, um die Fluoreszenz von oxidiertem ro2GFP anzuregen.

Zur Trennung von Anregungs- und Emissionslicht müssen dichroische Teiler-Sets mit entsprechenden Grenzwellenlängen ausgewählt werden. Diese Teiler sorgen für die Reflexion des kurzwelligen und Transmission des langwelligen Lichts. Die in dieser Arbeit verwendeten Laser und dichroischen Teiler sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Zur konfokalen Laserscanning-Mikroskopie verwendete Filtersets.**

Anwendung	Fluoreszenz-Proteine	Laserwellenlänge [nm]	Beam splitter	Filter
Lokalisation von ERD2	EGFP	488	HFT 488; NFT 490	BP 500-530
Kolokalisationsstudien	EGFP mCherry	488 543	HFT 488; NFT 490 HFT 514; NFT 545	BP 500-530 LP 560
BiFC	mCherry	514	HFT 514; NFT 545	LP 560
ratiometrische Fluoreszenzmessung	ro2GFP <sub>ox</sub> ro2GFP <sub>red</sub>	2x 800 488	KP 700 HFT 488	BP 500-550 BP 500-550

### 16.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Fluoreszenzmikroskopie werden verschiedene Fluorochrome eingesetzt, um selektiv zelluläre Strukturen anzufärben. Lipophile Fluoreszenzfarbstoffe reichern sich in Membranen an (Maier *et al.*, 2002). An Antikörper gebundene Fluorochrome können in permeabilisierten Zellen Proteine hochspezifisch

sichtbar machen und liefern inzwischen bei hoher Photostabilität eine optimierte Ausbeute (Panchuk-Voloshina *et al.*, 1999). Die Verwendung von Fusionsproteinen aus dem zu untersuchenden zellulären Protein und einem Fluoreszenzprotein ermöglicht die Analyse von Verteilungsmustern in lebenden Zellen. Inzwischen sind zahlreiche fluoreszierende Proteine bekannt, die z.T. durch rationales Design optimiert wurden. So ist inzwischen das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts durch die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzproteine abgedeckt (Shaner *et al.*, 2005). Das bekannteste Fluoreszenzprotein ist das grün fluoreszierende Protein (GFP), welches erstmalig von Shimomura aus *Aequorea victoria* isoliert und charakterisiert wurde (Shimomura *et al.*, 1962).

In Tabelle 9 sind die fluoreszierenden Proteine aufgelistet, die in dieser Arbeit den mikroskopischen Nachweis von Fusionsproteinen erbracht haben. Für GFP-Fusionen in den Kollokalisationsstudien wurde eine modifizierte Gensequenz des Grün fluoreszierenden Proteins, „yeast enhanced green fluorescent protein“ (yEGFP) eingesetzt, die auf die Codon-Verwendung in *S. cerevisiae* optimiert ist. Diese GFP-Variante enthält gleichzeitig im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz den Aminosäure-Austausch S65G und S72A, womit eine höhere Fluoreszenzintensität erzielt wird (Cormack *et al.*, 1997). Während EGFP eine leichte Tendenz zeigt, Dimere zu bilden, führt der Aminosäure-Austausch A<sub>206</sub>K zu einem rein monomeren Fluoreszenzprotein (Zacharias *et al.*, 2002). Mit dieser Variante wurde ebenfalls die Lokalisation von Erd2p-Fusionen in Hefezellen untersucht. mCherry ist ein monomeres Derivat des aus *Discosoma sp.* isolierten rot fluoreszierenden dimerischen dsRED (Shaner *et al.*, 2004). mCherry wurde in dieser Arbeit in den Kollokalisationsstudien zur Herstellung von Fusionsproteinen zur Fluoreszenzmarkierung von zellulären Markerproteinen und im Bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsassay eingesetzt.

**Tabelle 9: Verwendete Fluoreszenzproteine, deren Absorptions- und Emissionsmaxima**

Fluoreszenzprotein	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
EGFP	488	507
EGFPA <sub>206</sub> K	488	507
mCherry	587	610
ro2GFP	405/488	507

## 16.2 Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

In der Arbeit wurden alle Aufnahmen an lebenden, unfixierten Zellen durchgeführt. Um die Hefezellen zu immobilisieren und damit auch längere Aufnahmezeiten zu ermöglichen wurde eine Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer auf 50°C angewärmten 1 %igen „low melting point“-Agarose-Lösung (Biozym, Oldendorf) gemischt und vor dem Erkalten auf Objektträger aufgebracht.

## 16.3 Ratiometrische Fluoreszenzmessungen

Eine weitere GFP-Variante, redoxsensitives GFP (roGFP), fand ihren Einsatz bei Untersuchungen zur Membrantopologie von Erd2p. Die von Hanson *et al.* (2004) charakterisierte Variante ro2GFP erhält durch die Sequenzänderungen S147C, Q204C und S65T zwei von den Redox-Bedingungen der Umgebung abhängige Anregungsmaxima. Bei Oxidation steigt die Emission nach Anregung mit 400 nm, die Emission nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 480 nm sinkt. Bei Reduktion hingegen lässt sich die Emission nach Anregung mit 480 nm steigern, während die Emissionsintensität nach Anregung mit 400 nm fällt. Die Wellenlänge des Emissionsmaximums bleibt unverändert. Änderungen im Redoxzustand des Proteins können durch die Veränderung des Quotienten aus der Emission nach Anregung mit 400 nm geteilt durch die Emission nach Anregung mit 488 nm bestimmt werden (Brach *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden ratiometrische Fluoreszenzanalysen an Zellen nach Expression von ro2GFP-Fusionsproteinen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Anregung mit Laserlicht der

Wellenlänge 400 nm wurde dabei durch das Zwei-Photonen-System „Chameleon“ (Coherent, Glasgow, UK) bei 800 nm vermittelt. An den unbearbeiteten Aufnahmen wurden die gemittelten Fluoreszenzintensitäten nach Anregung mit 488 nm und nach Anregung mit 400 nm über die Software LSM Image Examiner (Zeiss) bestimmt. Nach Subtraktion der Intensitäten der Kontrolle ohne Expression eines Fluoreszenzproteins wurde der Quotient  $\text{ex400/ex488}$  ermittelt. Dieser Quotient liegt bei oxidierenden Bedingungen hoch, bei reduzierenden Bedingungen sinkt er.

#### **16.4 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)**

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation beruht auf der Rekonstitution eines in zwei Teile gespaltenen Fluoreszenzproteins. In dieser Arbeit wurde ein BiFC-System mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry angewendet. Hierbei wird mCherry zwischen den Aminosäuren 159 und 160 in ein N-terminales und ein C-terminales Fragment gespalten (Fan *et al.*, 2008). Gelangen beide Fragmente in unmittelbare räumliche Nähe zueinander, wird das Fluoreszenzprotein komplettiert, das Fluorophor wird gebildet und die Fluoreszenzeigenschaften sind wiederhergestellt. Werden beide Fragmente koexprimiert, reicht ihre eigene Affinität zueinander nicht aus, um die Rekonstitution zu ermöglichen. Um die Interaktion zweier zellulärer Proteine nachzuweisen, wird ein Fragment mit dem Fängerprotein und das andere Fragment mit einem Beuteprotein fusioniert. Werden beide Fusionsproteine koexprimiert, zeigt eine Fluoreszenz die Rekonstitution von mCherry an und weist damit auf eine direkte Interaktion zwischen Fänger- und Beuteprotein hin.

## 17. Wachstumstests

### 17.1 Agardiffusionstest

Der Nachweis der Sensitivität von Hefezellen gegen das Toxin K28 wurde mit Hilfe des Agardiffusionstests in Methylenblauagar (MBA) durchgeführt. Methylenblau wird in toten Zellen aufkonzentriert und sorgt gleichzeitig für einen höheren Kontrast zwischen bewachsem und unbewachsenem Agar. Für einen MBA-Test wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aus einer Übernachtskultur in 8 ml Minimalmedium mit Methylenblau eingebettet. In ein eingestanztes Loch mit einem Durchmesser von 1 cm wurden 100 µl K28-Toxinkonzentrat gegeben. Das Toxin diffundiert in den Agar ein, wobei die Konzentration und damit die Toxizität vom Mittelpunkt zur Peripherie logarithmisch abnimmt. Die nach sieben Tagen vermessene Größe des Hemmhofs, innerhalb dessen kein Wachstum festzustellen ist, ist dabei ein Maß für die Sensitivität des eingebetteten *S. cerevisiae* Stamms.

### 17.2 Wachstumsstudien mit dem „Ras recruitment system“

Das „Ras recruitment system“ (RRS) ermöglicht den *in vivo* Nachweis der Interaktion zweier Proteine. Das System beruht auf der Notwendigkeit des monomeren G-Proteins Ras, Plasmamembran-lokalisiert vorzuliegen, um seine Funktion im cAMP-Signalweg wahrnehmen zu können. Es eignet sich daher speziell für den Nachweis der Wechselwirkungen zwischen Proteinen der Plasmamembran. Die im Test eingesetzte *S. cerevisiae* Mutante *cdc25-2* zeigt einen temperaturabhängigen Wachstumsdefekt bei 36°C. Dieser Phänotyp kann nur kompensiert werden, wenn ein konstitutiv aktives Säuger-Ras-Protein exprimiert wird, das über die Fusion an ein anderes Protein bis zur Plasmamembran gelangt. Im Testsystem wurden *cdc25-2* Transformanten bei der permissiven Temperatur von 20°C unter induzierenden Bedingungen kultiviert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden auf entsprechenden Galaktose-d/o-Agarplatten ausgestrichen. Es wurden je zwei Testplatten angefertigt, die parallel bei 20°C und bei 36°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Nach fünf bis acht Tagen wurde das Wachstum ausgewertet.

## 18. Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller**

Hersteller (Firmensitz)	Produkte
5Prime	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
Ambion (Austin, USA)	Lachssperma-DNA
analyticjena (Jena)	„innuPREP Kit Plasmid Mini Kit“
Applichem	T4 DNA-Ligase-System, Magermilchpulver, X-Gal, Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol
BioRad (München)	Elektroporationsküvetten, Whatman Blotting-Papier
Biozym (Oldendorf)	Agarose, DNA Low Melt Agarose
Difco (Detroit, USA)	„YNB without aminoacids and ammoniumsulfate“
Eurogentec (Seraining, Belgien)	„smart ladder“ DNA-Größenstandard
Fermentas (St. Leon-Rot)	Dnase-freie Rnase, Restriktionsendonukleasen, „page ruler prestained“ Protein-Größenstandard
Formedium (Norfolk, GB)	Galaktose
GE Healthcare (Freiburg)	„full range rainbow molecular weight marker“
Invitrogen (Darmstadt)	„pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit“, yeast GFP clone
Marcor (New Jersey, USA)	Agar, Casein-Pepton, Hefeextrakt
Millipore (Eschborn)	Nitrocellulose-Dialysefilter
Müller's Mühle (Gelsenkirchen)	Glukose
Nalgene (Roskilde, Dänemark)	Kryoröhrchen
NEB (Frankfurt)	EndoH
Novagen (Darmstadt)	„Acceptor pSTBlue-1 Vektor Kit“

Omega bio-tek (Norcross, USA)	„E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit“
Roche Diagnostics (Mannheim)	„Expand™ High Fidelity PCR system dNTPack“, „Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film“, „Protease inhibitor cocktail tablets“, PVDF-Membran
Serva (Heidelberg)	β-Mercaptoethanol, DMSO
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Ampicillin, Bromphenolblau, TEMED
Tetenal (Norderstedt)	„Roentogen Liquid“, „Roentogen Superfix“
Thermo Scientific (Rockford, USA)	„SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“
Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe)	alle weiteren Chemikalien

### III Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p in der Hefe *S. cerevisiae*. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf der Lokalisation, der Membranstruktur des Rezeptors und seiner Funktion bei der Endozytose des Proteintoxins K28 liegen. Die Untersuchungen lassen sich in vier Schwerpunktbereiche gliedern. Zunächst wurden Studien zur Lokalisierung des Rezeptors durchgeführt. Im zweiten Teil wurde die Topologie des Rezeptors analysiert. In darauf folgenden Untersuchungen wurden Sequenzmotive zur endozytotischen Internalisierung des Rezeptors identifiziert und deren Beteiligung an der Sensitivitätsvermittlung gegen das Killertoxin K28 überprüft. Abschließend wurden Untersuchungen zur Ubiquitinierung des Rezeptors durchgeführt.

#### 1. Nachweis der Kolo-kalisation des HDEL-Rezeptors Erd2p in der Plasmamembran von *S. cerevisiae*

Frühere Untersuchungen zeigten eine Abhängigkeit der K28-Aufnahme von der Verfügbarkeit des HDEL-Rezeptors Erd2p. Studien zum Bindungsverhalten von Späroplasten nach Überexpression des Rezeptors bestätigten seine Bedeutung für die Bindung des Toxins an der Plasmamembran (Heiligenstein, 2008; Spindler, 2004). Auf diesen Beobachtungen basiert das aktuelle Modell der K28-Aufnahme, wonach der Rezeptor nicht nur eine Rolle bei dem retrograden Transport des Toxins spielt, sondern zusätzlich in vermutlich geringer Kopienzahl den Aufnahmeprozess über die Plasmamembran vermittelt (Schmitt und Breinig, 2006). Zusätzlich zu der beschriebenen Lokalisation von HDEL- und KDEL-Rezeptoren in ER und Golgi-Kompartimenten konnte die Verteilung des Rezeptors im Bereich der Zellgrenzen bisher nur in einer Hefe-Mutante mit blockiertem Endozytoseweg (*end3*) nachgewiesen werden (Lewis und Pelham, 1990; Semenza et al., 1990; Heiligenstein, 2008).

Um die postulierte Funktion von Erd2p als Rezeptor für das Toxin K28 auf Ebene der Plasmamembran zu bestätigen, wurde zunächst die zelluläre Verteilung dieses HDEL-Rezeptors in *S. cerevisiae* untersucht. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Bestätigung der Plasmamembran-Kolokalisation von Erd2p durchgeführt; der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des Rezeptors und ein *in vivo* Reporterassay für Plasmamembranproteine.

## **1.1 Untersuchungen zur zellulären Verteilung von Erd2pGFP-Varianten in *S. cerevisiae***

### **1.1.1 Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Expression verschiedener Erd2pGFP-Fusionen**

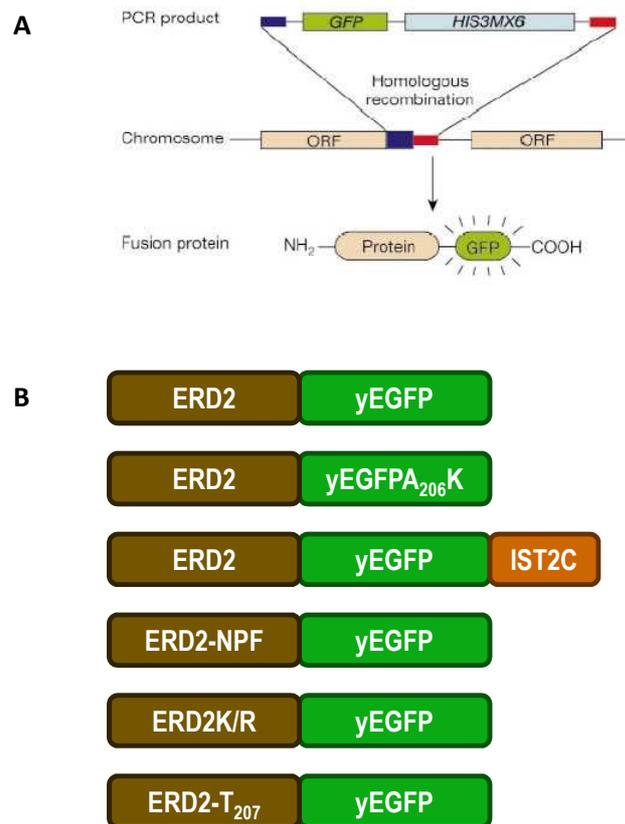
Im Hinblick auf die Lokalisierung des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p in *S. cerevisiae* durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen musste zunächst ein geeignetes Expressionssystem identifiziert werden. Der eingesetzte Hefestamm muss in der Lage sein, eine fluoreszenzmarkierte Variante des Rezeptors stabil und in ausreichender Kopienzahl zu exprimieren. In Abbildung 13 findet sich eine Übersicht aller *ERD2GFP*-Varianten, die in dieser Arbeit zur Lokalisierung des HDEL-Rezeptors in Hefe hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden.

Um die Verteilung eines Proteins in Hefezellen nah am wildtypischen Zustand beobachten zu können, wird in der Regel eine Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors bevorzugt. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Ansatz der *S. cerevisiae* Stamm YBL040cGFPclone wie unter Punkt 16 (Material und Methoden) beschrieben fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dieser kommerziell erhältliche Stamm ermöglicht die Expression von C-terminal GFP-markiertem Erd2p unter Kontrolle des eigenen Promotors und der eigenen 3' UTR. Die *GFP*-Sequenz ist auf chromosomaler Ebene in direktem Anschluss an das *ERD2*-Strukturgen integriert (Invitrogen, Darmstadt). Im Stamm YBL040cGFPclone sind sowohl ringförmige fluoreszierende Bereiche im Inneren der Zellen als auch punktförmige Strukturen im Zellinneren und im Zellgrenzbereich erkennbar, die sich jedoch nur schlecht von der Hintergrundfluoreszenz abheben (siehe Abbildung 14, A

und B). Eine Steigerung der Anregungsintensität erbrachte durch das damit einhergehende schnelle „bleaching“ des Farbstoffs keine Verbesserung der Signalstärke. Die Emissionsintensitäten im Stammhintergrund YBL040cGFPclone lassen keine hochauflösenden Aufnahmen zu, welche notwendig sind, um in Kolokalisationsstudien Aufschluss über die Erd2p-Verteilung innerhalb von Hefezellen zu geben.

Um die Fluoreszenzsignale durch eine höhere Kopienzahl zu verstärken, wurde eine GFP-markierte Rezeptor-Variante zur Expression unter Kontrolle eines starken Promotors konstruiert. Als Expressionsvektor wurde der Centromervektor pJD.6 mit *URA3*-Auxotrophie-Marker verwendet. Centromervektoren kommen in geringer Kopienzahl vor und zeichnen sich durch eine hohe mitotische Stabilität aus. Die vier Plasmide des pRS-Systems (Sikorski und Hieter, 1989) enthalten das gleiche Vektorrückgrat mit autonom replizierender Sequenz, Centromersequenz, einem bakteriellen „origin of replication“, einem Amicillinresistenz-Gen und einer „multiple cloning site“. Sie unterscheiden sich in den Auxotrophiemarkern und sind daher optimiert auf die kombinierte Nutzung in Hefezellen, um die Expression zweier oder mehrerer Gene unter gleichen Kontrollmechanismen zu ermöglichen. Die GFP-markierten *ERD2*-Varianten sind in dieser Arbeit stets in pRS316-Derivaten enthalten, Fusionsgene aus den kodierenden Sequenzen für die Markerproteine und das rot fluoreszierende mCherry in pRS315-Derivaten. Die pRS-Vektoren enthalten weder Promotor- noch Terminator-Sequenzen. Beide Komponenten sind in pJD.6 integriert (vgl. Material und Methoden, Punkt 2.1.3).

In pJD.6ERD2yEGFP ist das über SOE-PCR mit den Primern 5' ERD2, 5' ERD2EGFP, 3' ERD2EGFP und 3' EGFP hergestellte Fusionsgen aus *ERD2* und *yEGFP* unter Kontrolle des Promotors  $P_{GAL1}$  und des Terminators *CYC1TT* enthalten.

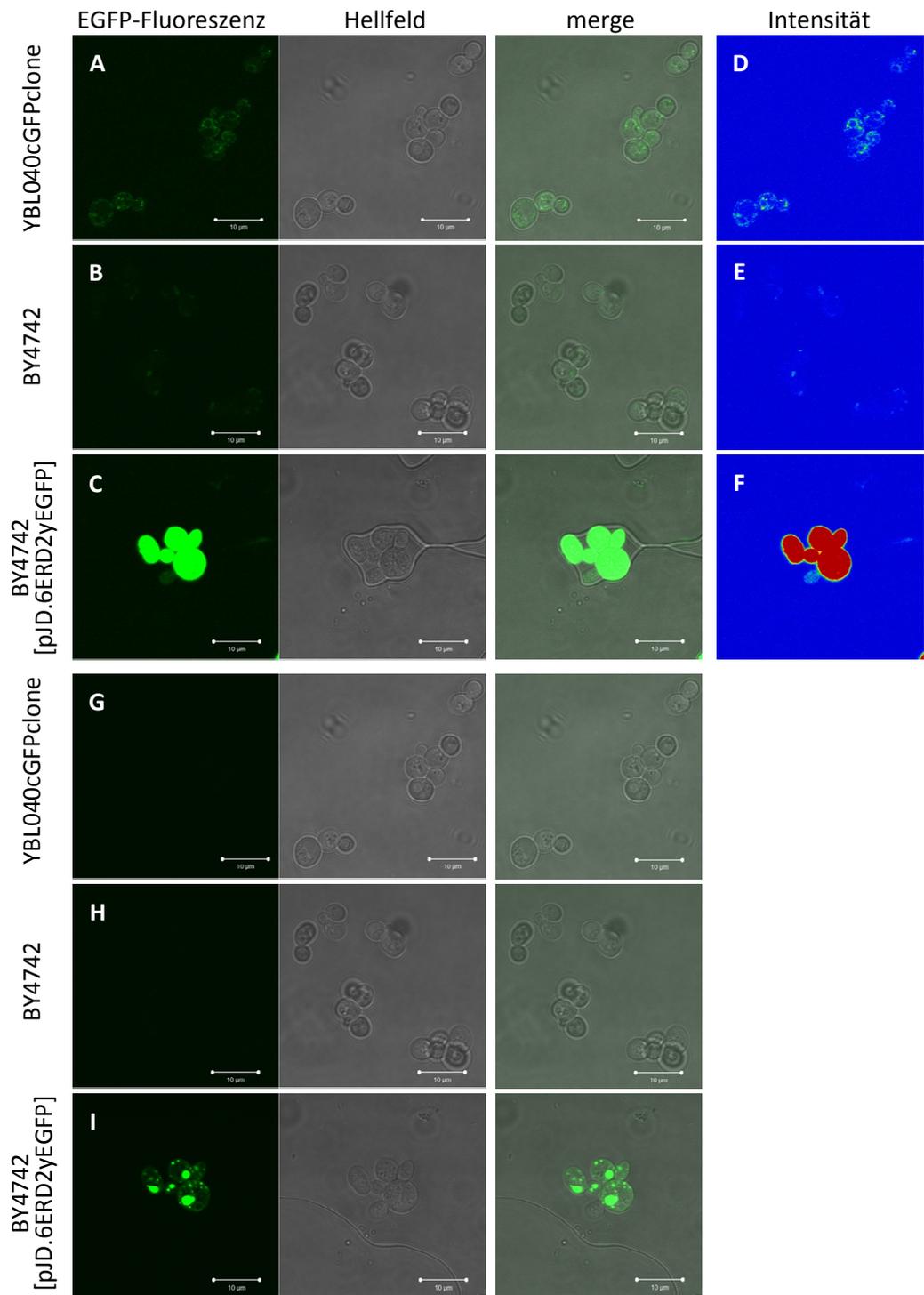


**Abbildung 13: Schematische Darstellung der zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten ERD2GFP-Derivate.**

(A) Klonierungsstrategie zur Erstellung der „yeast gfp collection“ (Invitrogen, Darmstadt). Die aus dieser Sammlung stammende Hefe YBL040cGFPclone wurde eingesetzt, um die intrazelluläre Verteilung des HDEL-Rezeptors unter Expressionskontrolle des eigenen Promotors zu untersuchen.

(B) Schematische Darstellung der zur Lokalisation von Erd2p konstruierten Fusionsgene aus *ERD2* und *GFP*-Varianten. Neben wildtypischem *ERD2* und einem Fusionsgen mit dem DNA-Sequenzbereich für die 69 C-terminalen Aminosäuren von *IST2* (IST2C) wurden verschiedene Varianten der Gensequenz hergestellt, in denen potentielle Endozytosesignale deletiert sind. In *ERD2-NPF* sind die Codons des N-terminalen NPF-Motivs deletiert. *ERD2K/R* kodiert für ein Genprodukt, in dem die vier C-terminalen Lysinreste gegen Arginin ausgetauscht sind. In *ERD2-T<sub>207</sub>* ist das Codon für Threonin 207 deletiert. Die eingesetzten *GFP*-Derivate sind *yEGFP*, eine auf die Codon-Verwendung der Hefe optimierte *GFP*-Variante mit höherer Fluoreszenzausbeute im Vergleich zu wildtypischem *GFP* (Cormack *et al.*, 1997), und *yEGFPA<sub>206</sub>K*, dessen Genprodukt an Position 206 den Aminosäureaustausch Alanin nach Lysin aufweist und daher keine Dimere bildet (Zacharias *et al.*, 2002). Die dargestellten *ERD2GFP*-Derivate wurden unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors im Vektor pJD.6 exprimiert.

Der wildtypische *Saccharomyces cerevisiae* Stamm BY4742 wurde mit dem Expressionsvektor pJD.6ERD2yEGFP transformiert. Die Expression wurde 24 h in Galaktose-haltigem Medium bei 30°C induziert. In Abbildung 14 (D, E, F) sind die Fluoreszenzintensitäten in BY4742 [pJD.6ERD2yEGFP] und YBL040cGFPclone grafisch durch eine Farbkodierung verdeutlicht und dem Wildtyp BY4742 ohne Expression eines Fluoreszenzproteins gegenübergestellt. Während die Fluoreszenzintensität bei YBL040cGFPclone nur in einzelnen Punkten über den Intensitäten der Negativkontrolle BY4742 liegt, erreichen die Signale in BY4742 [pJD.6ERD2yEGFP] die Sättigungsgrenze. Wie aus Abbildung 14 (I) hervorgeht, erlauben die in BY4742 [pJD.6ERD2yEGFP] erreichten Fluoreszenzintensitäten bei veränderten LSM-Einstellungen höher auflösende Aufnahmen. Die intrazelluläre Erd2GFP-Verteilung ist in klar abgegrenzten, punktuellen Fluoreszenzsignalen erkennbar, die über die ganze Zelle verteilt vorliegen. Schwächer fluoreszieren ringförmige Strukturen im Zellinneren, die als Golgi-Kompartimente beschrieben sind (Schuldiner *et al.*, 2005) und einzelne Foki im Zellgrenzbereich.



**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Erd2GFP in *S. cerevisiae* YBL040c GFP clone und BY4742 pJD.6ERD2yEGFP.**

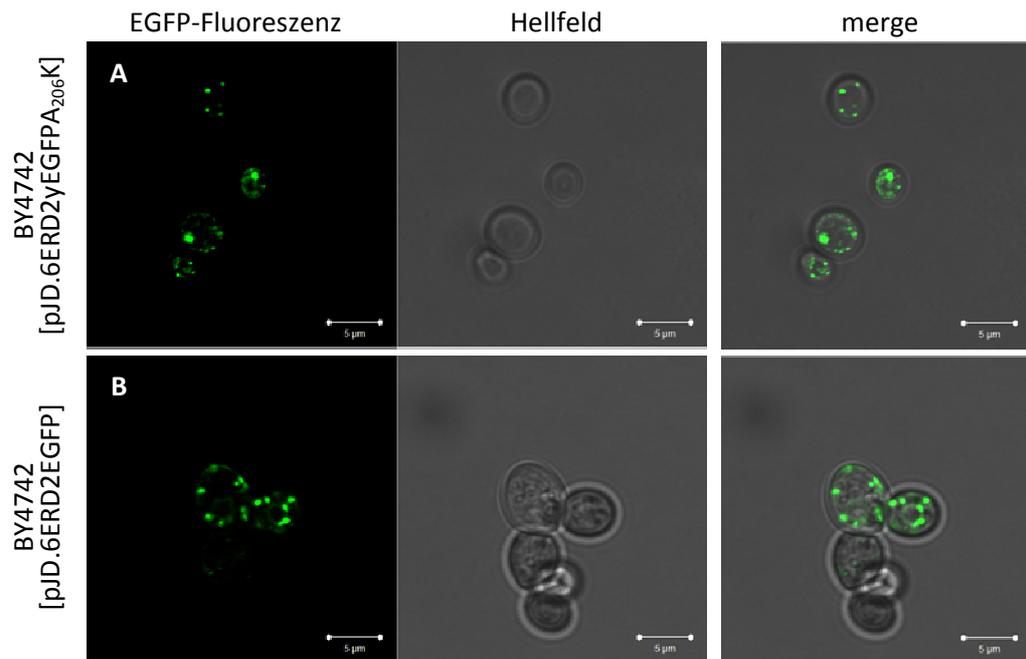
Die Abbildung zeigt die Erd2GFP-Fluoreszenz nach Expression unter Kontrolle des *ERD2*-Promotors in *S. cerevisiae* YBL040cGFPclone **(A)**. Als Kontrolle wurde der Wildtyp-Stamm BY4742 mitgeführt **(B)**. Im Vergleich ist die Fluoreszenz des Fusionsproteins nach Expression unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in BY4742 [pJD.6ERD2yEGFP] gezeigt **(C)**. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 10 µm; detector gain: 1004; average 8; scan speed 6; pinhole 240; transmission 10,1%

Farbkodierte Fluoreszenzintensitäten für YBL040cGFPclone **(D)**, den Wildtyp BY4742 **(E)** bzw. BY4742 [pJD.6ERD2yEGFP] **(F)**. Die detektierte Intensität ist für die links gezeigten Aufnahmen von blau (schwach) bis rot (Sättigung) angegeben. Bearbeitung: palette rainbow, Zeiss LSM Image Examiner v. 4.2.0.121

Expressionsmuster in YBL040cGFPclone **(G)**, BY4742 **(H)** bzw. BY4742 [pJD.6ERD2yEGFP] **(I)** unter verringerter Signalverstärkung. Die gleichen Bildausschnitte sind unter veränderten Einstellungen aufgenommen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 10 µm; detector gain: 600; average 8; scan speed 6; pinhole 240; transmission 10,1%

Um den Einfluss einer Dimerisierung von EGFP auf die Verteilung von Erd2EGFP in der Hefe auszuschließen, wurde als Kontrolle eine Fusion aus Erd2p und der rein monomeren GFP-Variante EGFP<sub>206K</sub> (Zacharias *et al.*, 2002) hergestellt (vgl. Material und Methoden, Punkt 2.1.3). Mit Hilfe der Primer 5' ERD2, 5'EGFP<sub>206K</sub>, 3' EGFP<sub>206K</sub> und 3' EGFP wurde über SOE-PCR der Austausch A<sub>206K</sub> in die *ERD2yEGFP*-Sequenz eingebracht. *ERD2yEGFP<sub>206K</sub>* wurde in den Vektor pSTBlue1 zwischenkloniert, sequenziert und in den Expressionsvektor pJD.6 inkloniert.

Nach Transformation von pJD.6ERD2EGFP<sub>206K</sub> in den *S. cerevisiae* Stamm BY4742 wurde die Expression unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors induziert und die intrazelluläre Verteilung des markierten Rezeptors fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nach Transformation mit pJD.6 ERD2yEGFP<sub>206K</sub> zeigt der Stamm BY4742 keine Unterschiede im Expressionsmuster zu Erd2EGFP. Es zeigen sich auch hier die punktuellen Signale im Zellinneren und im Zellrandbereich (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer Erd2p-Fusion mit monomerischem EGFP<sub>206</sub>K in *S. cerevisiae*.**

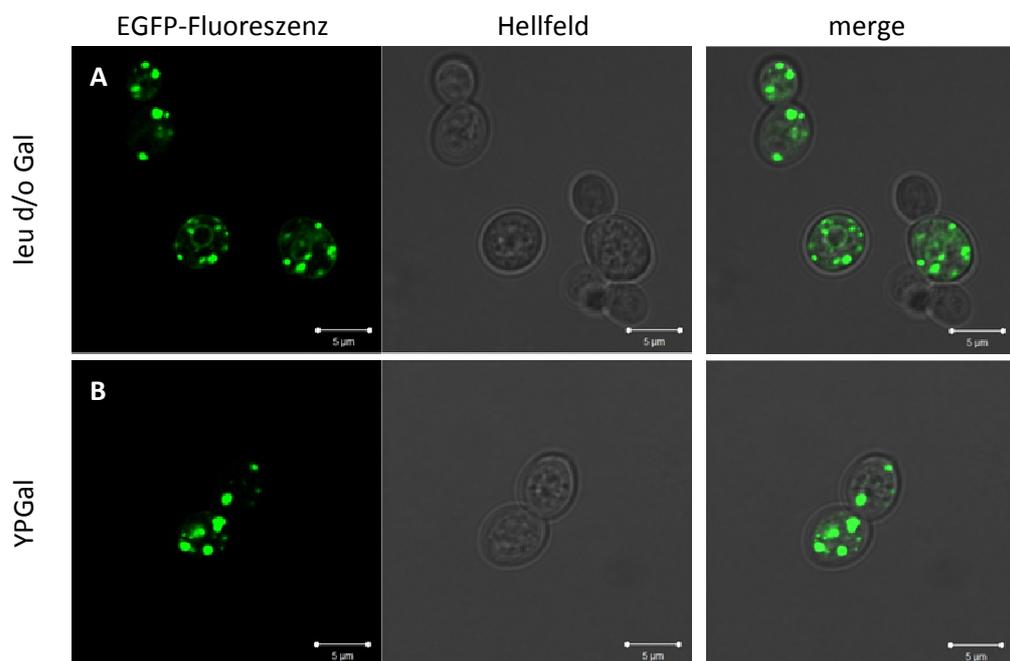
Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt das Expressionsmuster von Erd2EGFP<sub>206</sub>K (**A**) im Vergleich zu Erd2EGFP (**B**) in *S. cerevisiae* BY4742. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; detector gain: 772; average 8; scan speed 7; pinhole 200 µm; transmission 3,2%

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der von Schuldiner *et al.* (2005) beschriebene Einfluss des Kulturmediums auf die Verteilung des fluoreszenzmarkierten HDEL-Rezeptors untersucht. Um den Verlust des Expressionsplasmids durch den fehlenden Selektionsdruck in Komplexmedien zu verhindern, wurde in diesem Ansatz der *S. cerevisiae* Stamm YA ERD2EGFP eingesetzt. Dieser Stamm besitzt keine chromosomale Kopie des *ERD2*-Gens, sondern überlebt einzig durch die plasmidgetriebene EGFP-markierte Erd2p-Variante (vgl. Ergebnisse, Punkt 3.2.1).

Zunächst wurden die Zellen in Minimalmedium unter induzierenden Bedingungen über Nacht kultiviert. In einem Ansatz wurde anschließend Minimalmedium (leu d/o Gal) und in einem parallelen Ansatz Komplexmedium (YPGal) verwendet. Nach 24 Stunden wurde fluoreszenzmikroskopisch die Verteilung des markierten Rezeptors bestimmt. Abbildung 16 zeigt, dass keine deutlichen Unterschiede in der zellulären Verteilung erkennbar sind. Die von Schuldiner *et al.* (2005) beschriebenen

Golgi-Strukturen sind auch in den Zellen klar erkennbar, die in Minimalmedium kultiviert wurden. Auch die punktuellen Strukturen, die sich über das gesamte Zellinnere bis zu den Zellgrenzbereichen verteilen, finden sich in beiden Ansätzen.

Eine zuverlässige Aussage darüber, ob die im Grenzbereich der Zellen lokalisierten punktförmigen Signale der Ebene der Plasmamembran zuzuordnen sind, sollte im Folgenden durch Kollokalisationsstudien mit Markerproteinen erbracht werden.



**Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Erd2EGFP in *S. cerevisiae* YA ERD2EGFP in Minimal- und Komplexmedium.**

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen das Expressionsmuster von Erd2EGFP in YA ERD2EGFP nach Anzucht in Minimalmedium leu d/o Gal **(A)** und Komplexmedium **(B)**. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; detector gain: 772; average 8; scan speed 9; pinhole 200 µm; transmission 3,2%

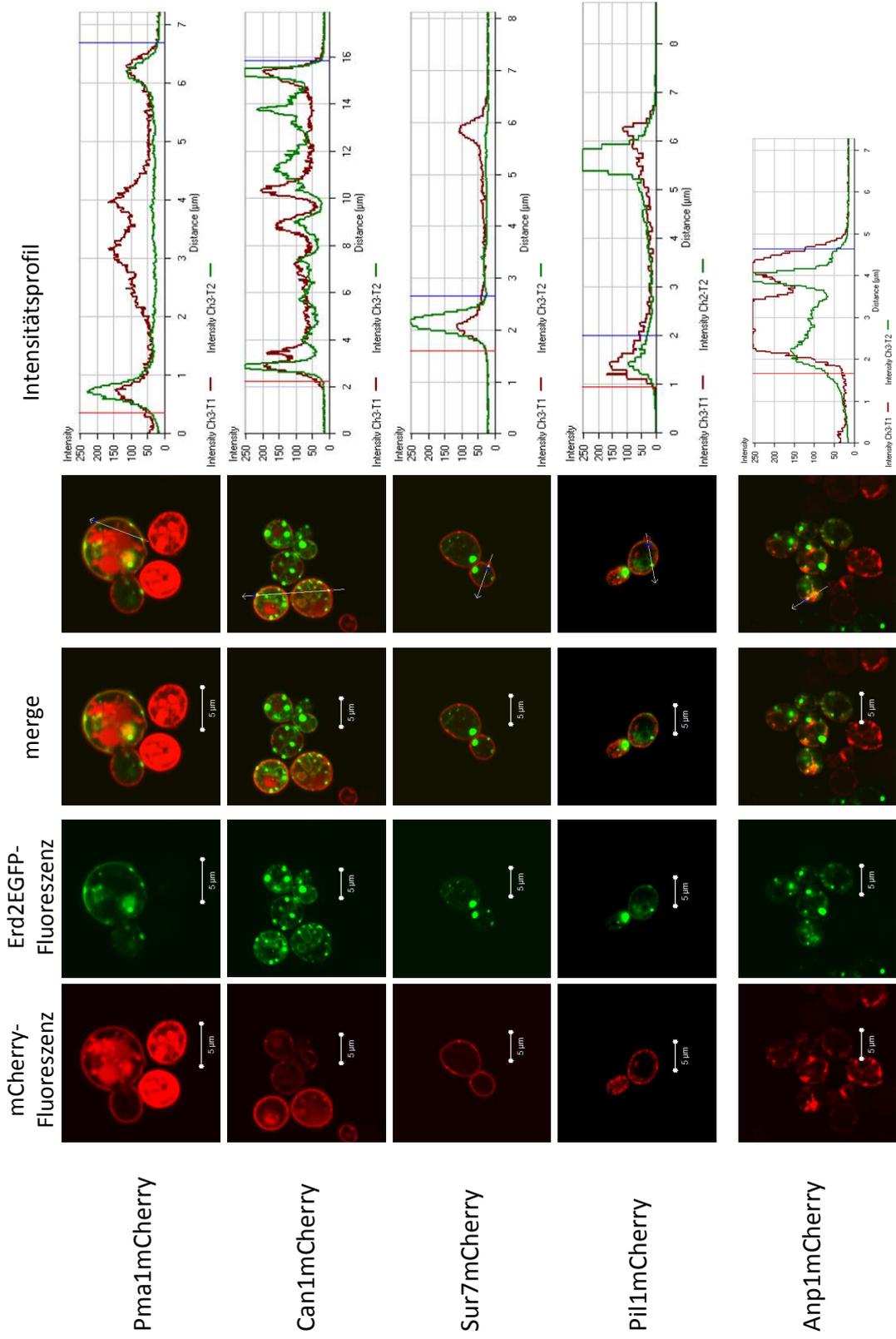
### 1.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Kollokalisationsstudien an GFP-markiertem Erd2p

Durch mikroskopische Aufnahmen, welche die vergleichende Lokalisierung von Erd2pEGFP mit Markerproteinen für zelluläre Substrukturen ermöglichen, sollte bestätigt werden, dass Erd2EGFP nicht nur im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat vorkommt, sondern auch in der Plasmamembran der Hefe kollokalisiert ist. Die Ebene der Plasmamembran sollte durch mCherry-markierte Varianten der Plasmamembran-ATPase Pma1p, der Arginin-Permease Can1p und den Eisosomenmarkern Pil1p und Sur7p sichtbar gemacht werden. Desweiteren wurden Kollokalisationsstudien mit dem Golgi-Marker Anp1p durchgeführt. Die Gene der Markerproteine wurden mit den entsprechenden Primern amplifiziert, in den Vektor pSTBlue1 zwischenkloniert und nach der Sequenzierung in den Expressionsvektor pJD.5 vor die mCherry-Gensequenz einkloniert (vgl. Material und Methoden, Punkt 2.1.4). Nach der Kotransformation mit pJD.6ERD2yEGFP in den Hefestamm BY4742 wurde die Expression beider Fusionsgene 24 h durch Galaktose-Zugabe induziert. Die Induktionszeit bei *CAN1mCherry* wurde auf 10 h reduziert und ein Medium mit 2 µg/ml Arginin statt 20 µg/ml gewählt, da das Genprodukt von *CAN1*, die Argininpermease, bei höheren Argininkonzentrationen verstärkt zur Vakuole transportiert wird (Grossmann *et al.*, 2008; vgl. Master-Arbeit Sevrieva, 2009).

Die Ergebnisse der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei allen Markerproteinen der Plasmamembran und der Eisosomen ist ein deutliches ringförmiges Fluoreszenzsignal im Zellrandbereich zu erkennen, das in einzelnen Foci im Zellgrenzbereich eine Überlagerung mit der Erd2pEGFP-Fluoreszenz zeigt. Die Kollokalisation wurde anhand von Intensitätsprofilen bestätigt. Während im Zellinneren keine Kollokalisation von Erd2pEGFP mit den Plasmamembranmarkern vorliegt, überlagern sich im Bereich der Plasmamembran in einzelnen punktuellen Strukturen die Intensitätsmaxima der EGFP- und der mCherry-Fluoreszenz. Es konnte keine Kollokalisation von Anp1p und Erd2p in abgegrenzten intrazellulären Strukturen detektiert werden. Bereiche mit hoher

Fluoreszenzintensität des mCherry-markierten Golgi-Markers überlappen nur teilweise mit den intrazellulären Strukturen, die durch Erd2EGFP angefärbt sind. Eine vollständige Übereinstimmung in den Verteilungsmustern von Erd2p existiert weder für die Plasmamembranmarker, noch für den Golgi-Marker Anp1p. Dies bestätigt eine auf mehrere zelluläre Substrukturen verteilte Lokalisation des HDEL-Rezeptors.

Wie erwartet kommt Erd2p nicht nur im Golgi vor, sondern auch in klar abgegrenzten intrazellulären Strukturen, die dem ER und Komponenten des vesikulären und tubulären Transports zwischen ER und Golgi entsprechen. Punktuelle Strukturen, wie sie durch die Kollokalisationsstudien unmittelbar unterhalb der Plasmamembran nachgewiesen wurden, könnten sowohl Transportvesikel zur Zelloberfläche als auch endosomale Strukturen darstellen. Die Kollokalisation der einzelnen Erd2EGFP-Foci mit den Plasmamembran- und Eisosomenmarkern im Zellgrenzbereich bekräftigt das von Heiligenstein (2008) postulierte Modell der intrazellulären Verteilung von Erd2p. Demnach kommt Erd2p in geringer Kopienzahl auch an der Zelloberfläche vor. Dieser geringe Anteil an Plasmamembran-ständigen Rezeptoren konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals durch die Expression fluoreszenzmarkierter Varianten unter Kontrolle eines starken Promotors nachgewiesen werden. Die Funktionalität der Erd2EGFP-Fusion wurde in späteren Experimenten in einer *erd2*-Deletionsmutante bestätigt (vgl. Ergebnisse, Punkt 3.2.1).



**Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Kollokalisationsstudien an Erd2EGFP und mCherry-markierten Markerproteinen in *S. cerevisiae* BY4742.**

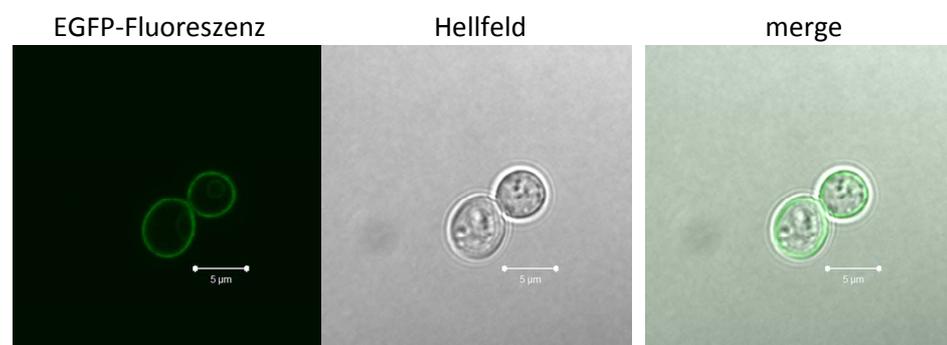
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die zelluläre Verteilung von Erd2EGFP in *S. cerevisiae* BY4742 nach Koexpression mit mCherry-markierten Markerproteinen. Pma1mCherry und Can1mCherry dienen der Anfärbung der Plasmamembran, Sur7mCherry und Pil1mCherry verdeutlichen eisosomale Strukturen an der zytosolischen Seite der Plasmamembran und der intrazelluläre Marker Anp1mCherry stellt eine Kontrolle für den Golgi-Apparat dar. Es sind jeweils die Einzelfluoreszenzen und deren Überlagerung dargestellt. Rechts sind die Intensitätsprofile über Bereiche mit Kollokalisation aufgeführt.

Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; detector gain (543 nm): 451 - 700; detector gain (488 nm): 581 - 791; mean 2 - 8; scan speed 6 - 8; pinhole (543 nm): 160 - 248; pinhole (488 nm): 160 - 240; transmission (543 nm): 9,1 - 52 %; transmission (488 nm): 4,1 - 50 %; Intensitätsprofile wurden mit Hilfe der profile-Funktion der Software Zeiss LSM Image Examiner v. 4.2.0.121 erstellt.

**1.1.3 Untersuchungen zur Lokalisation einer Erd2GFP-Variante mit zusätzlichem Transportsignal**

Der überwiegende Teil aller integralen Proteine der Plasmamembran erreicht über den klassischen Sekretionsweg durch ER und Golgi seinen Zielort. Daneben existieren aber auch unkonventionelle Mechanismen der Zielsteuerung zur Plasmamembran, die unabhängig von einem funktionellen Golgi-System aktiv sind. In *S. cerevisiae* gelangt das polytopische Membranprotein Ist2p unabhängig von COPII-Vesikel-Bildung, intra-Golgi-Transport und Vesikel-Fusion zur Zellperipherie. Die externe Zugabe von Proteasen führt zu einem Abbau von Ist2p. Dies zeigt, dass Ist2p in Hefe ohne den ER-Golgi-Transport spezifische Domänen der Plasmamembran erreicht, auch wenn kein vergleichbarer Transportweg in Säugerzellen zu existieren scheint. Der exakte Mechanismus des Übergangs vom kortikalen ER zur Plasmamembran ist noch nicht vollständig bekannt. Experimente mit Chimären aus anderen Membranproteinen, welche natürlicherweise nicht bis zur Zellperipherie gelangen, bestätigten die Bedeutung des C-Terminus von Ist2p als Transportsignal (Nickel und Seedorf, 2008; Jüschke *et al.*, 2005; Ercan *et al.*, 2009).

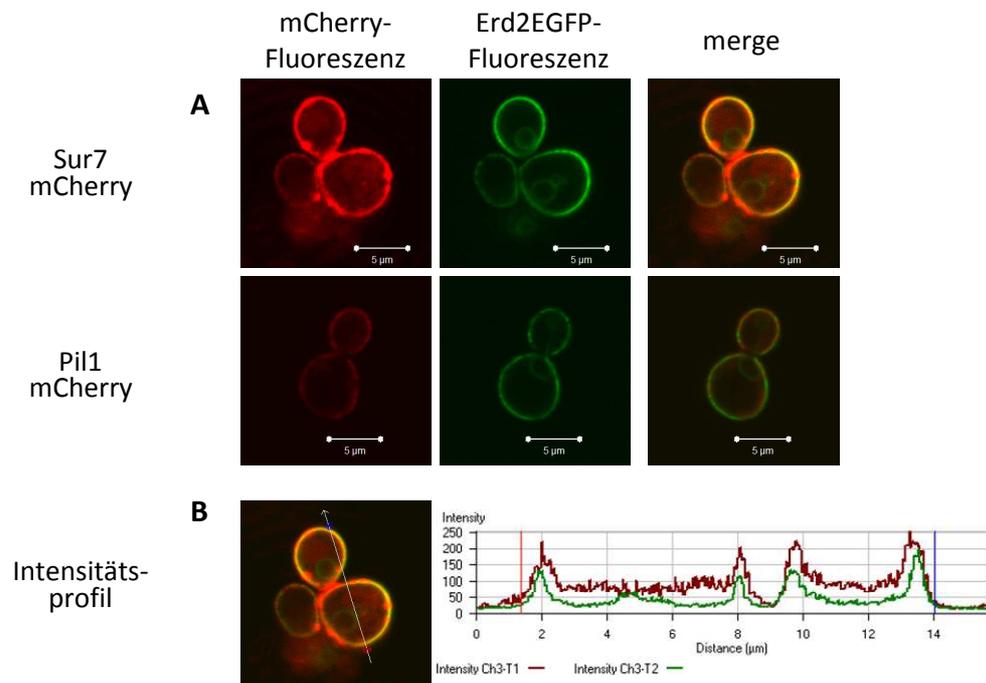
An einer Chimäre aus Erd2p, einer GFP-Markierung und dem C-Terminus von Ist2p sollte bestimmt werden, ob der HDEL-Rezeptor analog zu anderen Ist2p-Fusionen eine periphere Lokalisation in Hefezellen erreicht. Hierzu wurde die Genfusion aus *ERD2* und  $\gamma$ EGFP um die kodierende Sequenz für die 69 letzten Aminosäuren von Ist2p ergänzt. Dieser C-terminale Sequenzbereich von Ist2p sollte nach Franz *et al.* (2007) genügen, um den Anteil an Plasmamembran-lokalisiertem Erd2GFP zu steigern. Das Fusionsgen *ERD2 $\gamma$ EGFP<sub>IST2C</sub>* wurde in pJD.6 inkloniert (vgl. Material und Methoden, Punkt 2.1.3). Nach Transformation von BY4742 wurde die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert und die intrazelluläre Verteilung des Fusionsproteins in lebenden Zellen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht (vgl. Abbildung 18). Die Fluoreszenz von Erd2EGFP<sub>IST2C</sub> zeigt sich in der Zellperipherie und in ringförmigen Strukturen um den Zellkern, welche dem perinukleären ER entsprechen. Die peripheren Signale können sowohl das kortikale ER darstellen als auch die Plasmamembran. Die für Erd2pEGFP beobachteten, punktförmigen intrazellulären Strukturen bleiben nach dem Anfügen des C-Terminus von Ist2p aus. In Form dieser Chimäre ist es gelungen, eine Erd2p-Variante herzustellen, deren Lokalisation von ER- und Golgi-Strukturen hin zur Zellperipherie verschoben ist. Ein Einfluss dieser veränderten Lokalisation wurde in Studien zur Erd2p-Funktion näher untersucht (vgl. Punkt 3.2.2.4).



**Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer Erd2GFP-Variante mit zusätzlichem Transportsignal in *S. cerevisiae*.**

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt das Expressionsmuster von Erd2EGFP<sub>IST2C</sub> in *S. cerevisiae* BY4742. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5  $\mu$ m; detector gain: 604; average 4; scan speed 6; pinhole 240  $\mu$ m; transmission 10,1%

In Kolokalisationsstudien mit Markerproteinen der Plasmamembran sollte die Lokalisation von Erd2EGFP<sub>IST2C</sub> in der Zellperipherie bestätigt werden. Hierzu wurde der Stamm BY4742 mit pJD.6 ERD2yEGFP<sub>IST2C</sub> und einem der Plasmide zur Expression der mCherry-Markerproteine kotransformiert. Die intrazelluläre Verteilung beider Fusionsproteine wurde wie bereits beschrieben am konfokalen Laserscanning-Mikroskop bestimmt und ist in Abbildung 18 dargestellt. Erkennbar ist eine Überlagerung der grünen Fluoreszenz von Erd2EGFP<sub>IST2C</sub> und der roten Fluoreszenzsignale bei allen eingesetzten Markerproteinen. Am Beispiel der Koexpression von Sur7mCherry zeigt sich im Profil der Emissionsintensitäten im Zellgrenzbereich eine deutliche Überlagerung der Fluoreszenzmaxima beider Fusionsproteine.



**Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Kolokalisationsstudien an Erd2EGFP<sub>IST2C</sub> und mCherry-markierten Markerproteinen in *S. cerevisiae* BY4742.**

(A) Kolokalisationsstudien an BY4742 nach Koexpression von ERD2yEGFP<sub>IST2C</sub> und SUR7mCherry bzw. PIL1mCherry. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die zelluläre Verteilung von Erd2EGFP in *S. cerevisiae* BY4742 nach Koexpression mit mCherry-markierten Markerproteinen. Sur7mCherry und Pil1mCherry wurden zur Anfärbung der Plasmamembran verwendet. Es sind jeweils die Einzelfluoreszenzen und deren Überlagerung dargestellt.

Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; detector gain (543 nm): 652 - 836; detector gain (488 nm): 604 - 716; mean 4 - 8; scan speed 7 - 8; pinhole (543 nm): 248; pinhole (488 nm): 240 - 260; transmission (543 nm): 9,1 %; transmission (488 nm): 4,1 - 10,1 %.

(B) Intensitätsprofil der Fluoreszenz von Erd2EGFP<sub>IST2C</sub> und Pil1mCherry, erstellt mit Hilfe von Zeiss LSM Image Examiner v. 4.2.0.121, profile-Funktion.

Die Kollokalisierung von Erd2EGFP12C mit Markerproteinen der Plasmamembran konnte verdeutlichen, dass ein Anfügen des unkonventionellen Transportsignals von Ist2p die Verteilung des HDEL-Rezeptors von intrazellulären Strukturen zur Plasmamembran verschiebt. Es kann durch diese Studien allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die peripheren Signale dem kortikalen ER zuzuordnen sind und sich nicht einzig auf die Plasmamembran beschränken. Die relativ geringe Größe von Hefezellen lässt keine genauere räumliche Einordnung der Signale zu. Sollte es gelungen sein, durch das Anfügen des Ist2p-C-Terminus den Rezeptor in einer höheren Kopienzahl in der Plasmamembran zu lokalisieren, könnte dies eine Auswirkung auf die rezeptorvermittelte Endozytose von K28 haben. Um diese Frage zu beantworten, sollte in späteren Experimenten zur Funktion des Rezeptors die *in vivo* Funktionalität dieser Chimäre untersucht und der Einfluss des zusätzlichen Sortiersignals auf die Endozytose von K28 bestimmt werden (vgl. Punkt 3.2.2.4).

## **1.2 Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation von Erd2p durch das „RAS recruitment system“**

Das „Ras recruitment system“ (RRS) ist ein *in vivo* Testsystem zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion in *S. cerevisiae*. Im Gegensatz zu anderen Methoden wie dem „Yeast two hybrid“-System werden jedoch nicht zwei zytosolische Interaktionspartner eingesetzt. Die Nachweisreaktion erfolgt an der Plasmamembran und setzt einen membranständigen Interaktionspartner voraus. Der Mechanismus, auf dem das RRS beruht, wurde erstmals 1985 von Toda *et al.* beschrieben. Das monomere G-Protein RAS interagiert an der zytosolischen Seite der Plasmamembran mit der Adenylatzyklase Cyr1p, der essentiellen Komponente des cAMP-Signalwegs. RAS selbst wird über das Genprodukt von *CDC25* durch einen GDP/GTP-Austausch aktiviert (Broek *et al.*, 1987). Die temperatursensitive Mutante *cdc25-2* ist bei 36°C nicht mehr in der Lage, die Aktivität des hefeeigenen RAS-Proteins zu regenerieren und stellt das Wachstum ein (Petitjean, 1990). Im RRS wird daher eine konstitutiv aktive RAS-Variante aus Säugern (mRAS) exprimiert, der die CAAX-Box, das

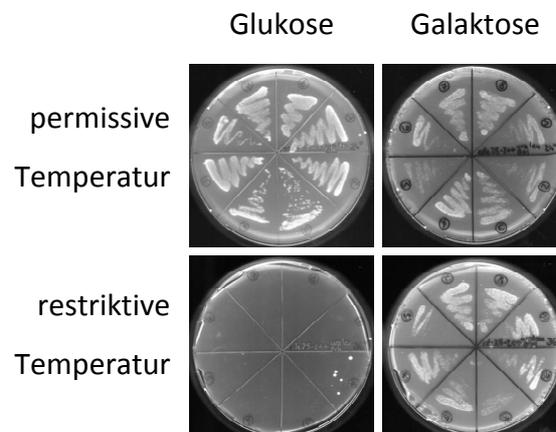
Signal zur Farnesylierung fehlt, welche für die Plasmamembranlokalisation des G-Proteins notwendig ist. Nur durch eine anfusionierte Komponente, welche den Transport zur Plasmamembran vermittelt, kann mRAS seinen Wirkungsort erreichen und den Wachstumsarrest aufheben. Die Lokalisation von mRAS an der Plasmamembran wird im von Broder und Mitarbeitern (1998) etablierten RRS durch eine Interaktion von einem Plasmamembranprotein mit einem an mRAS gekoppelten Beute-Protein vermittelt. Denkbar ist auch eine Verankerung eines löslichen Proteins über eine Farnesylierung oder Myristylierung, das über seinen Interaktionspartner das anfusionierte mRAS an die Membran heranführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Methode etabliert, mit deren Hilfe die Lokalisation eines integralen Membranproteins an der Plasmamembran detektiert werden kann. Die eingesetzte Methode greift nicht auf den Interaktionspartner eines Membranproteins zurück, der als Vehikel mRAS indirekt zur Membran transportiert, sondern nutzt den direkten Plasmamembran-Transport von mRAS in einer Fusion am C-Terminus des Membranproteins, in diesem Fall Erd2p. Die Aktivierung der Adenylatzyklase Cyr1p kann in *S. cerevisiae cdc25-2* nur dann erfolgen, wenn Erd2RAS über den Sekretionsweg bis zur Plasmamembran gelangt. Die resultierende Aufhebung des temperatursensitiven Phänotyps ist experimentell über Wachstumstests unkompliziert zu detektieren.

Als Positivkontrolle wurde das von Broder *et al.* (1998) beschriebene Interaktionspaar c-JunRAS, eine Fusion der DNA-Bindedomäne c-Jun und der RAS-Variante des Testsystems, und ein myristyliertes JDP2-Derivat, ein Mitglied der Leucin-Zipper-Familie, eingesetzt. Hierzu wurden die Vektoren pADNS-JZ-Ras und pUra-M-JDP2 in den Stamm *cdc25-2* kotransformiert. Die Doppel-Transformanden wurden in *ura leu d/o Glc*-Medium angezogen und parallel auf je zwei Glukose- und Galaktose-haltige Agarplatten ausgestrichen, von denen jeweils eine bei der permissiven Temperatur (20°C) und eine bei der restriktiven Temperatur (36°C) inkubiert wurde.

Wie erwartet konnte nach fünf Tagen bei restriktiver Temperatur nur auf dem induzierenden Galaktose-haltigen Medium ein Wachstum festgestellt werden,

während die Doppel-Transformanden auf reprimierendem Medium kein Wachstum zeigten (vgl. Abbildung 20).



**Abbildung 20: Wachstumstest nach Expression des Interaktionspaars c-JunRAS und M-JDP2 in *S. cerevisiae cdc25-2* als Positivkontrolle für das „Ras recruitment system“.**

Die Abbildung zeigt den Wachstumstest an dem temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Stamm *cdc25-2* nach Expression der beiden Interaktionspartner c-JunRAS und M-JDP2. Acht Kotransformanden wurden parallel auf induzierendes Galaktose-haltiges und reprimierendes Glukose-haltiges Medium ausplattiert und bei permissiver wie restriktiver Temperatur inkubiert.

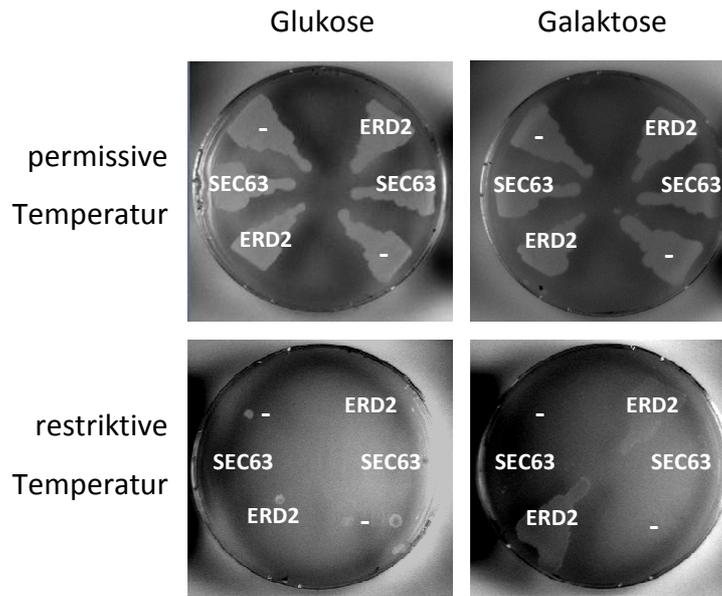
Abbildung 21 zeigt in schematischer Darstellung die Fusionskonstrukte, die im RRS zur Bestätigung der Plasmamembran-Kolokalisation von Erd2p getestet wurden. Als Testplasmid diente *ERD2RAS* im Centromervektor pJD.6. Als Negativkontrolle wurde der Expressionsvektor pADNS-JZ-Ras mitgeführt, der ohne Koexpression des membranlokalisierten Interaktionspartners M-JDP2 kein Wachstum erlauben sollte. Eine Genfusion aus *RAS* und *SEC63* sollte als Kontrolle mitgeführt werden. Bei Sec63p handelt es sich um ein Membranprotein, dessen Funktion und Lokalisation auf das ER beschränkt ist. Der C-Terminus von Sec63p wurde experimentell als zytosolisch bestätigt (Rothblatt *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1997; Feldheim *et al.*, 1992). Mit der Expression von *SEC63RAS* sollte überprüft werden, ob eine Aktivierung des Cyc1p-abhängigen Wachstumssignalwegs im RRS aus ER-Membranen möglich ist.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der im „RAS recruitment system“ eingesetzten RAS-Fusionsgene.**

Die Abbildung zeigt in schematischer Darstellung die Genfusionen, die zur Bestätigung der Plasmamembran-Kolokalisation von Erd2p im „RAS recruitment system“ eingesetzt wurden. *ERD2RAS* diente dem Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation von Erd2p. c-JunRAS und das myristylierte JDP2-Derivat M-JDP2 sind ein von Broder *et al.* (1998) bestätigtes Interaktionspaar, das ein positives Signal im RRS liefert. Mit der Fusion aus *SEC63* und *RAS* sollte die Möglichkeit einer Aktivierung des RRS-Signalwegs aus ER-Membranen überprüft werden.

Die Expressionsplasmide pJD.6ERD2RAS, pJD.6SEC63RAS und pADNS-JZ-Ras wurden in den Teststamm *cdc25-2* transformiert. Die Anzucht der Transformanten erfolgte unter induzierenden Bedingungen in Galatkosehaltigem Medium bei der permissiven Temperatur von 20°C. Der Phänotyp wurde bei permissiver und restriktiver Temperatur sowohl unter induzierter als auch unter reprimierter Expression auf entsprechenden Agar-Platten bestimmt (vgl. Material und Methoden, Punkt 17.2). Die Ergebnisse des Wachstumstests mit Expression von *ERD2RAS*-Expression und den beiden Kontrollen sind in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22: Wachstumstest nach Expression von RAS-Fusionsgenen in *S. cerevisiae cdc25-2* zum Nachweis der Plasmamembran-Kokalisation von Erd2p durch das „Ras recruitment system“.**

Die Abbildung zeigt den Wachstumstest an dem temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Stamm *cdc25-2* nach Expression von RAS-Fusionsgenen. Es wurden jeweils zwei Transformanten parallel auf induzierendes Galaktose-haltiges und reprimierendes Glukose-haltiges Medium ausplattiert und bei permissiver wie restriktiver Temperatur inkubiert.

**ERD2RAS:** *cdc25-2* [pJD.6ERD2RAS]

**SEC63RAS:** *cdc25-2* [pJD.6SEC63RAS]

**(-)** *cdc25-2* [pADNS-JZ-Ras]

Ein klar erkennbares Wachstum der *cdc25-2* Mutante tritt unter restriktiven Bedingungen nur bei Expression von *ERD2RAS* auf. ER-ständiges Sec63pRAS kann den temperatursensitiven Phänotyp ebenso wenig aufheben wie das rein zytosolisch lokalisierte RAS ohne Zielsteuerungssignal zur Membran. Eine ER-Lokalisation von RAS-Fusionsproteinen reicht demnach nicht aus, um ein positives Wachstumssignal im RRS zu liefern. Das Anfügen von RAS an Erd2p hingegen konnte dem G-Protein zu einer Lokalisation an der Plasmamembran verhelfen. Somit konnte bestätigt werden, dass Erd2p nicht nur in intrazellulären Membransystemen von ER und Golgi vorkommt, sondern in der Lage ist, die Plasmamembran zu erreichen.

## 2. Topologie des HDEL-Rezeptors Erd2p

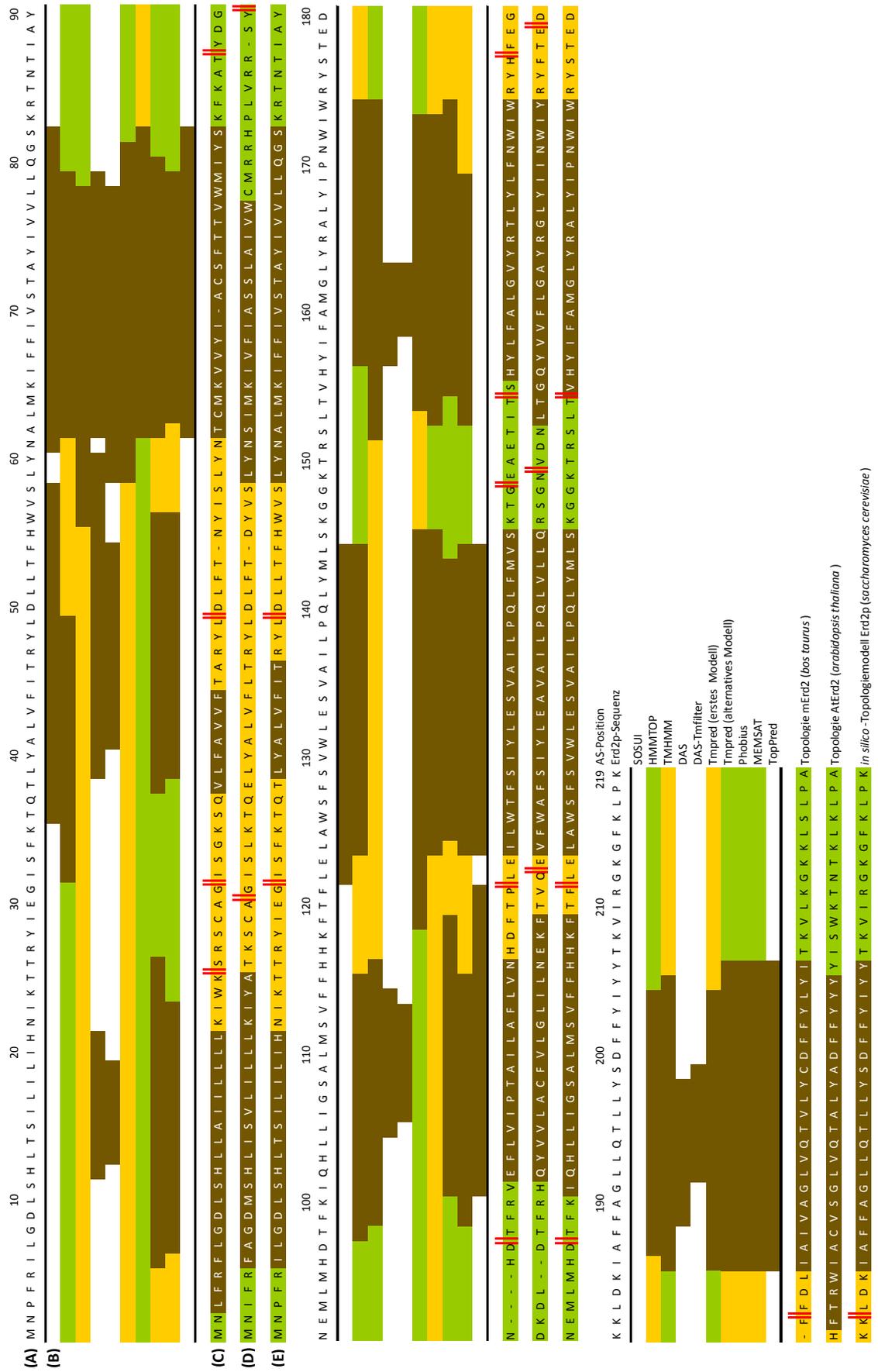
Die Topologie eines Membranproteins bestimmt, welche Sequenzbereiche die Membran durchspannen und legt die Orientierung der verbindenden „loop“-Strukturen als zytoplasmatisch oder nicht-zytoplasmatisch fest. Die Kenntnis dieser Anordnung der Polypeptidkette ist essentiell, um Protein-Domänen identifizieren zu können, welche mit anderen zellulären Bestandteilen interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Topologie des HDEL-Rezeptors Erd2p der Hefe *S. cerevisiae* bestimmt werden. Im Hinblick auf die Funktion von Erd2p als Rezeptor zur Internalisierung des K28-Toxins galt es, die Zugänglichkeit potentieller Transportsignale für zytosolische Komponenten der Endozytosemaschinerie zu bestimmen. Zu diesem Zweck sollte zunächst unter Zuhilfenahme von Vorhersage-Algorithmen ein *in silico* Topologie-Modell ermittelt werden. Schließlich sollte ein Reportersystem etabliert werden, das experimentell die *in vivo* Topologie des HDEL-Rezeptors aufklären kann.

### 2.1 *In silico* Topologie Analyse der Erd2p-Sequenz

Es ist bekannt, dass die Verteilung der Aminosäuren im Bereich einer membrangängigen  $\alpha$ -Helix stark von der in den hydrophilen Elementen eines Membranproteins abweicht. Transmembranhelices enthalten vorrangig hydrophobe Aminosäuren, polare Aminosäuren befinden sich hauptsächlich in Sequenzbereichen, die in wässriger Umgebung vorliegen. Übergangsbereiche weisen vermehrt aromatische Aminosäuren auf. Diese Verteilung von Aminosäuren sowie bereits experimentell bestätigte Topologien bekannter Transmembranproteine bilden die Grundlage bioinformatischer Algorithmen, welche anhand der Primärstruktur eines Proteins dessen potentielle Transmembraneinheiten und deren Orientierung vorhersagen (von Heijne, 2006).

Um einen ersten Anhaltspunkt zur experimentellen Bestimmung der Topologie des HDEL-Rezeptors Erd2p der Hefe *S. cerevisiae* zu erhalten, wurde zunächst eine *in silico* Topologie-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die frei verfügbaren Vorhersage-Programme des „ExPASy proteomics server“ (Expert Protein Analysis System) des Swiss Institute of Bioinformatics angewandt ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Die durch die einzelnen Vorhersagen erhaltenen Topologie-Modelle sowie die bereits experimentell bestätigten Topologien zweier Homologe zu Erd2p sind in Abbildung 23 vergleichend dargestellt. In gleicher farblich kodierter Darstellung ist das in dieser Arbeit erstellte *in silico* Topologie-Modell gezeigt, anhand dessen die Strategie zur *in vivo* Topologie-Analyse entworfen wurde.



**Abbildung 23: *In silico*-Topologie Modell für Erd2p aus *S. cerevisiae*.**

Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz von Erd2p **(A)** und die grafische Darstellung von zehn Topologie-Modellen **(B)** durch Vorhersage-Algorithmen. Zum Vergleich sind die Topologie-Modelle für den homologen Säugerrezeptor mErd2 **(C)** nach Singh *et al.* (1993) und den homologen Pflanzenrezeptor AtErd2 **(D)** nach Brach *et al.*, (2008) dargestellt. Durch einen Abgleich der Vorhersagen für Erd2p und den bereits bestätigten Topologie-Modellen für die beiden Homologe wurde ein *in silico*-Topologie-Modell **(E)** für Erd2p erstellt.

Rote Doppelstriche zeigen die Positionen an, bis zu denen in der Topologie-Analyse über Reportersysteme die ERD2-Fragmente C-terminal verkürzt wurden. Die Topologie der Proteinsequenzen ist durch folgende Farbkodierung verdeutlicht:

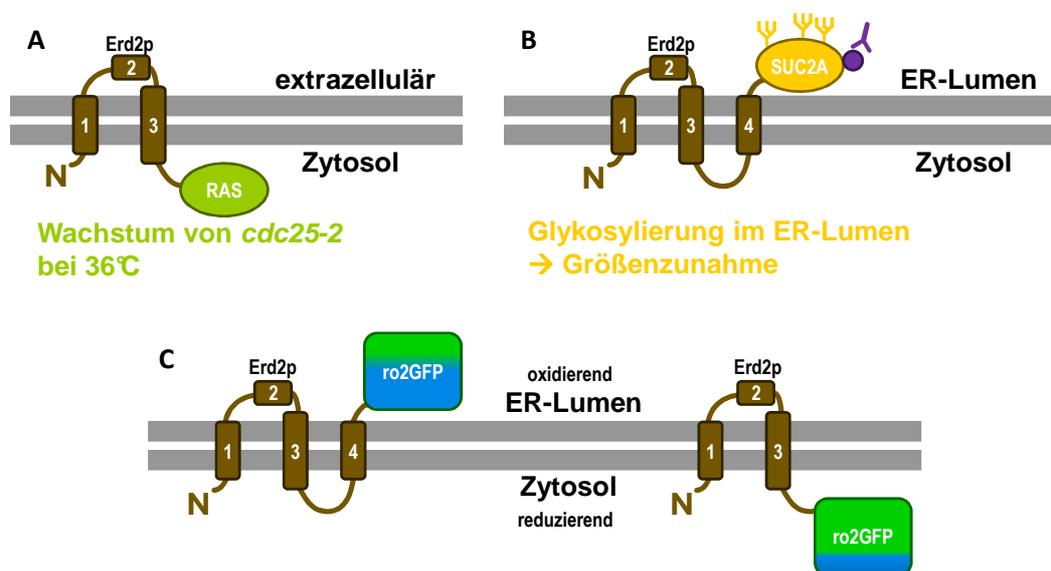
- potentielle Transmembranbereiche
- zytoplasmatische Bereiche
- nicht-zytoplasmatische Bereiche
- nicht-membrangängige Bereiche ohne Festlegung der Orientierung

Der Vergleich der zehn Topologie-Modelle zeigt, dass die Vorhersagen im Bereich der hydrophoben Einheiten 3, 4, 5, 6 und 7 eine hohe Übereinstimmung ergeben. In der Festlegung der ersten beiden potentiellen Transmembranbereiche differieren die Modelle stark. Vier der sechs Algorithmen, welche die Bestimmung der „loop“-Orientierung ermöglichen, geben den C-Terminus als zytosolisch an. Bezüglich zytosolischer oder nicht-zytosolischer Lokalisation des N-Terminus und der ersten drei „loops“ ist über die verwendeten Programme keine eindeutige Aussage möglich.

Im Vergleich mit den bereits experimentell untermauerten Topologie-Modellen des bovinen Homologs sowie des KDEL-Rezeptors aus *Arabidopsis thaliana* lassen sich sieben hydrophobe Einheiten bestimmen, die eine hohe Sequenzidentität zu Erd2p aus *S. cerevisiae* aufweisen. Anhand der identifizierten hydrophoben Elemente wurden Positionen festgelegt, an denen der Rezeptor für *in vivo* Topologie-Experimente C-terminal hinter jedem potentiellen Transmembranelement verkürzt wurde. Die Verkürzung wurde vorzugsweise an Positionen durchgeführt, welche den Trunkierungsmustern am bovinen KDEL-Rezeptor und dem Homolog aus *Arabidopsis thaliana* entsprechen (Singh *et al.*, 1993; Brach *et al.*, 2008).

## 2.2 *In vivo* Topologie-Analyse von Erd2p

Nachdem anhand von *in silico* Analysen und Sequenzabgleich mit zwei Homologen ein Topologiemodell für den HDEL-Rezeptor Erd2p erstellt wurde, sollte dieses Modell über ein *in vivo* Testsystem validiert werden. Es kamen drei Testsysteme zum Einsatz, die in Kombination die zytosolische bzw. nicht-zytosolische Orientierung des C-Terminus jedes der sieben hydrophoben Elemente bestätigen sollten. Die Versuchsstrategie ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.



**Abbildung 24: Modell der drei Testsysteme zur *in vivo* Topologie-Analyse von Erd2p in *S. cerevisiae*.**

**(A) RRS.** Ein Wachstum der temperatursensitiven Mutante *cdc25-2* kann nur erfolgen, wenn der C-Terminus eines verkürzten Erd2p-Fragments mit dem angefügten Reporterprotein RAS zytosolisch orientiert ist.

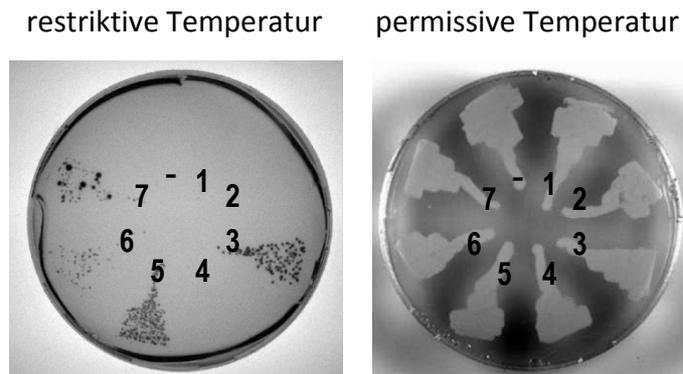
**(B) SUC2AV5.** Eine Glykosylierung des Reporters SUC2AV5 (Invertase-Kassette) erfolgt nur, wenn der C-Terminus eines verkürzten Erd2p-Fragments Zugang zum ER-Lumen hat. Die Größenzunahme kann durch SDS-PAGE und Western-Analyse nachgewiesen werden.

**(C) ro2GFP.** Der C-terminal angefügte redoxensitive Reporter ro2GFP zeigt unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften zwischen ER-Lumen und Zytosol. Die Auswertung erfolgt mikroskopisch durch ratiometrische Fluoreszenzmessung.

### 2.2.1 *In vivo* Topologie-Analyse von Erd2p über den Wachstumsreporter RAS

Bei einer Lokalisation des C-Terminus eines verkürzten Erd2p-Fragments auf der zytosolischen Seite der Membran muss ein Nachweissystem ausgewählt werden, das auf einer Reaktion basiert, die nur im Zytosol stattfindet. In der Regel kommen zu Topologie-Analysen in *S. cerevisiae* Wachstumsexperimente nach Expression von Fusionen mit einem Enzym aus einem essentiellen Stoffwechselschritt zum Einsatz (Sengstag *et al.*, 1990; Gilstring und Ljungdahl 2000). Nachdem jedoch Genfusionen mit *HIS3* und *HIS4* zur *in vivo* Topologie-Kartierung von Erd2p erfolglos blieben (Diplomarbeiten Gießelmann, 2007 und Kolb, 2008), wurde in dieser Arbeit ein anderes Nachweisverfahren gewählt. Ein Fusionsprotein aus Erd2p mit dem monomeren G-Protein RAS erwies sich bereits als stabil und konnte den Nachweis der Plasmamembranlokalisierung von Erd2p erbringen (vgl. Ergebnisse, Punkt 1.2). Analog zu den bereits beschriebenen Wachstumstests wurden im Folgenden sukzessive um potentielle Transmembraneinheiten verkürzte Erd2p-Varianten auf ihre Fähigkeit untersucht, eine lösliche RAS-Variante an die zytosolische Seite der Membran zu transportieren.

Die Gensequenz des Reporters RAS wurde „in frame“ hinter die sieben verkürzten *ERD2*-Varianten *ERD2.1* bis *ERD2.7* kloniert. Die Verkürzungspositionen wurden entsprechend des *in silico* Topologie-Modells gewählt (vgl. Abbildung 23). Jede verkürzte Erd2p-Variante endet dabei hinter einem der potentiellen Transmembransegmente und wird von der Sequenz des Reporters mRAS gefolgt. Die Fusionsgene *ERD2.1RAS* bis *ERD2.7RAS* wurden in den Vektor pJD.6 inkloniert und in den *S. cerevisiae* Stamm *cdc25-2* transformiert. Nach Anzucht der Transformanden unter induzierenden Bedingungen bei der permissiven Temperatur von 20°C wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf Glukose- und Galaktose-haltiges Medium ausgestrichen und parallel bei 20°C und bei der restriktiven Temperatur (36°C) inkubiert. Nach fünf bis acht Tagen wurde das Wachstum überprüft. Die Ergebnisse dieser Wachstumstests sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25: Wachstumstest nach Expression der Fusionsgene aus den sukzessive verkürzten *ERD2*-Fragmenten und dem Reporter *RAS* im „Ras recruitment system“.**

Die Abbildung zeigt den Wachstumstest an dem temperatursensitiven *S. cerevisiae* Stamm *cdc25-2* nach Expression der sukzessive verkürzten *Erd2p*-Fragmente mit dem C-terminal angefügten Topologie-Reporter *RAS*. Die Transformanden wurden auf induzierende Galaktose-haltige Agarplatten ausgestrichen und parallel bei permissiver wie restriktiver Temperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Stamm *cdc25-2* nach Expression von *c-JunRAS* mitgeführt.

- (1) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.1RAS]
- (2) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.2RAS]
- (3) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.3RAS]
- (4) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.4RAS]
- (5) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.5RAS]
- (6) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.6RAS]
- (7) *cdc25-2* [pJD.6ERD2.7RAS]
- (-) *cdc25-2* [pADNS-JZ-Ras]

Die Expression der verkürzten *ERD2*-Varianten *ERD2.3*, *ERD2.5*, *ERD2.6* und *ERD2.7* mit dem C-terminal angefügten Reporter *RAS* führen in *cdc25-2* zur Aufhebung des temperatursensitiven Phänotyps. Die verkürzten Reporterkonstrukte *ERD2.1RAS*, *ERD2.2RAS* und *ERD2.4RAS* sind nicht in der Lage, das Wachstum bei restriktiver Temperatur wieder herzustellen. In Entsprechung zu dem in dieser Arbeit erstellten *in silico* Topologie-Modell (vgl. Abbildung 23) sollte ein Wachstum nur möglich sein, wenn wie in den verkürzten Konstrukten *ERD2.3*, *ERD2.5* und *ERD2.7* eine gerade Anzahl an Transmembran-Helices vorliegt. Der C-Terminus hinter der hydrophoben Einheit sechs liegt dem *in silico* Modell zufolge ER-luminal bzw. extrazellulär vor. Im dargestellten Wachstumstest ist dennoch ein geringes Wachstum nach Expression von *ERD2.6RAS* zu verzeichnen. Dies Ergebnis ist nicht vereinbar mit der verifizierten zytosolischen Orientierung der C-Termini nach den

hydrophoben Einheiten fünf und sieben. Diese Orientierung der direkt benachbarten Transmembran-Elemente bedingt durch ihre parallele Integrationsrichtung eine entgegengesetzte, antiparallele Orientierung des dazwischen liegenden Elements sechs. Die Orientierung der sechsten potentiellen Transmembraneinheit sollte deshalb durch ein alternatives Testsystem überprüft werden. Die übrigen sechs hydrophoben Elemente bestätigen nach dem RRS-Wachstumstest das *in silico* erstellte Modell.

Das Wachstum nach Expression von *ERD2.1RAS* zeigt die zytosolische Orientierung des N-Terminus an. Die Expression von *ERD2.2RAS*, der Rezeptor-Variante mit zwei hydrophoben Elementen, lieferte kein Wachstumssignal. Wie bereits in der durchgeführten *in silico* Analyse beschrieben, scheint die zweite hydrophobe Einheit keine ausreichende Länge aufzuweisen, um eine Integration in die Membran zu ermöglichen. Die Expression des Reporters am C-Terminus der dritten potentiellen Transmembraneinheit ebenso wie am Ende der fünften und siebten ermöglicht ein Wachstum und bekräftigt das Topologiemodell. Das vierte potentielle Transmembransegment ist in der RRS-Analyse entsprechend dem Modell nicht-zytosolisch ausgerichtet. Wird das widersprüchliche Ergebnis nach Expression von *ERD2.6RAS* außer Acht gelassen, bestätigt die mittels RRS ermittelte *in vivo* Topologie von Erd2p das *in silico* erstellte Modell. Die in dieser Arbeit etablierte modifizierte RRS-Methode wurde somit erfolgreich als *in vivo* Testsystem zur Topologie-Analyse von Erd2p eingesetzt.

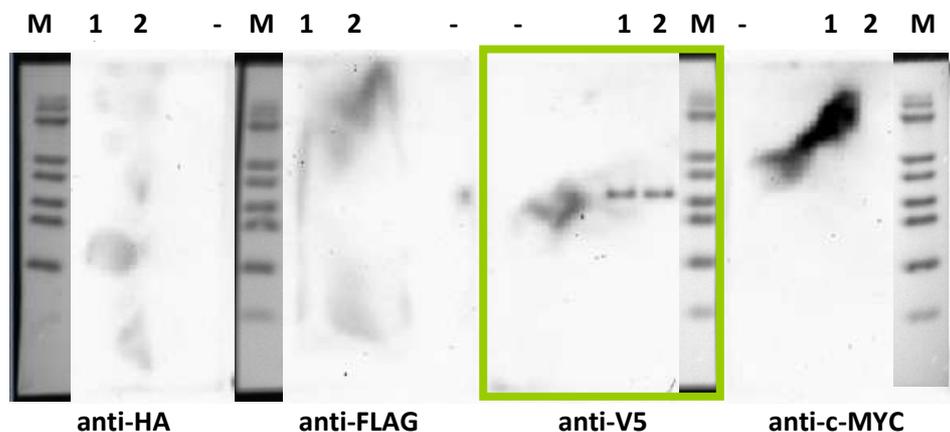
### 2.2.2 *In vivo* Topologie Analyse von Erd2p über den Glykosylierungsreporter SUC2AV5

Die Ergebnisse des ersten *in vivo* Topologie-Reportersystems, welches auf das Zytosol beschränkt arbeitet, sollten durch ein zweites System komplettiert werden. Ein alternativer Reporter muss Signale für die entgegengesetzte Orientierung der C-Termini von Transmembraneinheiten liefern und damit auf einer Reaktion im ER-Lumen oder im Extrazellulärbereich basieren.

Die N-Glykosylierung von Proteinen erfolgt ausschließlich im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums eukaryotischer Zellen. Dort wird auf einen Asparagin-Rest des Zielproteins innerhalb der auch als Sequon bezeichneten Erkennungssequenz NXS/T (Asparagin - beliebige Aminosäure – Serin oder Threonin) das „Core“-Oligosaccharid übertragen. Dessen Endbereich wird zunächst im ER einem „Trimming“ unterzogen und kann im Golgi-Apparat weiteren Prozessierungsschritten unterliegen (Lehle *et al.*, 2006). Diese sowohl sequenz- als auch organellspezifische Modifikation wurde in der vorliegenden Arbeit als Nachweisreaktion genutzt, um innerhalb von Erd2p ER-luminale Sequenzbereiche zu identifizieren. Da Erd2p selbst kein endogenes Glykosylierungssequon besitzt, sollte sich diese Nachweismethode in besonderem Maße zur Analyse seiner Topologie eignen.

In Hefe wurde die Glykosylierungsreporter-Kassette SUC2A, eine Teilsequenz des *in vivo* glykosylierten Enzyms Invertase mit drei Glykosylierungsstellen, bereits erfolgreich zur Topologie-Kartierung eingesetzt (Gilstring und Ljungdahl, 2000). Diese Sequenz wurde über entsprechende Primer in aufeinanderfolgenden SOE-PCR-Schritten mit den kodierenden Sequenzen für die „tags“ HA, FLAG, V5 und MYC versehen. Diese „tags“ sollten den Nachweis der exprimierten Fusionsproteine in Western-Analysen ermöglichen. Nachdem in Vorversuchen nur der V5-Antikörper einen Nachweis des Fusionsproteins aus Erd2p und dem Reporterkonstrukt in vergleichenden Western-Analysen ermöglichte (vgl. Abbildung 26), sollte der Nachweis über das V5-tag geführt werden.

Das im Folgenden als SUC2AV5 bezeichnete Reporterkonstrukt wurde hinter die sukzessive verkürzten *ERD2*-Varianten kloniert. Die Fusionsgene *ERD2.1SUC2AV5* bis *ERD2.7SUC2AV5* wurden in den Vektor pJD.6 inkliniert und in den *S. cerevisiae* Stamm BY4742 transformiert. Nach 42-stündiger Induktion in Galaktose-haltigem Minimalmedium wurde an  $5 \times 10^8$  Zellen ein Hefezellaufschluss durchgeführt, um das Gesamtzelllysat zu gewinnen. Es wurde eine Proteinfällung mit Aceton durchgeführt, um die Proteine zu konzentrieren (vgl. Material und Methoden, Punkte 14 und 15). Nach SDS-PAGE und Western-Analyse gab eine Größenzunahme der Fusionsproteine Aufschluss über eine ER-luminale Orientierung des entsprechenden verkürzten C-Terminus.



**Abbildung 26: Western-Analyse von *ERD2.7SUC2AV5* über verschiedene Primärantikörper.**

Die Abbildung zeigt die Western-Analyse des Ganzzelllyses zweier Klone von *S. cerevisiae* BY4742 [pJD.6ERD2.7SUC2AV5] und den Nachweis mit Primärantikörpern gegen folgende „tags“: HA, FLAG, V5, c-MYC. Die Zelllysate wurden durch Glasperlenzellaufschluss aus  $5 \times 10^8$  Zellen erhalten. Mitgeführt wurde das Ganzzelllysat des wildtypischen Stamms ohne Expression eines Fusionsproteins. Die Auftrennung erfolgte in 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen.

**(M)** Protein-Größenstandard „page ruler prestained“ (Fermentas)

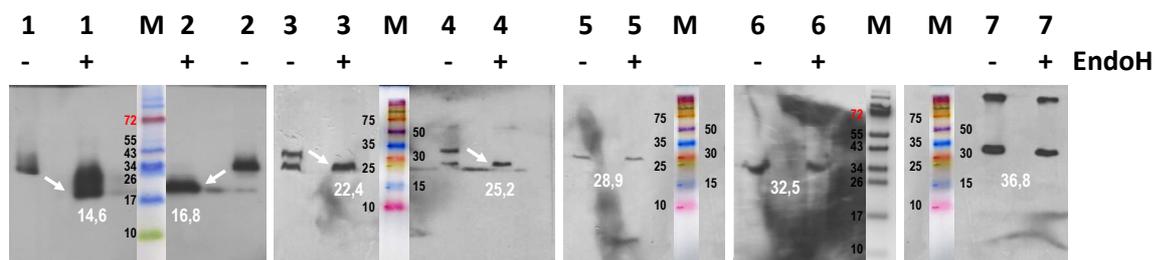
**(1)** BY4742 [pJD.6ERD2.7SUC2AV5].1

**(2)** BY4742 [pJD.6ERD2.7SUC2AV5].2

**(-)** Negativkontrolle BY4742

Als Sekundär-Antikörper wurde stets ein HRP-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Der Nachweis wurde über eine Chemolumineszenzreaktion und Entwicklung auf Fotofilmen erbracht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine Deglykosylierung der Zellysate durchgeführt. Mit Hilfe der „mobility shift“-Analyse sollte die Modifikation glykosylierter Erd2p-Derivate bestätigt werden. Dabei wurde das Ganzzelllysat einem EndoH-Verdau unterzogen, bevor die Western-Analyse durchgeführt wurde. EndoH ist eine aus *Streptomyces plicatus* isolierte Glykosidase, die spezifisch die N-Glykosylierung von Glykoproteinen des „high mannose“-Typs entfernt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 27 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 27: Western-Analyse des „mobility shift“-Assays an verkürzten Erd2p-Varianten zur Bestimmung der *in vivo* Topologie von Erd2p in *S. cerevisiae*.**

Die Abbildung zeigt die Western-Analyse der Zellysate von BY4742 nach Expression von Fusionsgenen aus den verkürzten *ERD2*-Varianten und dem Glykosylierungsreporter *SUC2A*. Benachbarte Spuren zeigen jeweils das unbehandelte Lysat sowie die Probe nach Deglykosylierung mit EndoH. Nach Auftrennung im 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-V5-Antikörper und einem sekundären HRP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, der über eine Chemolumineszenzreaktion die Detektion auf Fotofilmen ermöglichte.

**M:** Protein-Größenstandard „page ruler prestained“ (Fermentas)

**1:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.1SUC2AV5

**2:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.2SUC2AV5

**3:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.3SUC2AV5

**4:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.4SUC2AV5

**5:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.5SUC2AV5

**6:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.6SUC2AV5

**7:** Ganzzelllysate aus BY4742 ERD2.7SUC2AV5

- : vor EndoH-Verdau

+ : nach EndoH-Verdau

Die Western-Analyse lässt erkennen, dass die Fusionskonstrukte für die verkürzten *ERD2*-Varianten *ERD2.1*, *ERD2.2*, *ERD2.3* und *ERD2.4* eine Größenzunahme von ca. 10 kDa gegenüber dem theoretischen Molekulargewicht aufweisen. Dies weist auf eine N-Glykosylierung hin, welche durch einen EndoH-Verdau der Fusionsprodukte bestätigt werden konnte. Eine N-Glykosylierung in Form des „Core“-Oligosaccharids GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> (GlcNAc: N-Acetylglycosamin; Man: Mannose; Glc: Glukose) steigert das Molekulargewicht eines Proteins um ca. 2,6 kDa. Nach Abspaltung der Oligosaccharid-Modifikation konnten Signale detektiert werden, die der theoretischen Größe der Fusionsproteine entsprechen. Diese Differenz entspricht zumindest einer einfachen „Core“-Glykosylierung aller drei Sequons.

Wie erwartet, zeigten die Genprodukte mit den verkürzten *ERD2*-Varianten *ERD2.5SUC2AV5* und *ERD.7 SUC2AV5* im hier verwendeten Testsystem keine Glykosylierungsmuster. Das Ganzzelllysate nach Expression der Variante *ERD2.3SUC2AV5* zeigte wider Erwarten zwei Signale in der Western-Analyse. Nach EndoH-Verdau war nur noch das Signal niedrigeren Molekulargewichts erkennbar, was eine N-Glykosylierung vermuten lässt. Die Ergebnisse bestätigen die Orientierung der hydrophoben Sequenzbereiche 1, 2, 4, 5 und 7 entsprechend des *in silico* Topologie-Modells. Das abweichende Ergebnis für die Variante *ERD2.3* sollte über ein drittes Testsystem überprüft werden, welches einen Nachweis auf beiden Membranseiten ermöglicht.

Die Ergebnisse des Glykosylierungsassays lassen auch Rückschlüsse auf die Membran-Insertion stark verkürzter Erd2p-Varianten zu. Der Nachweis der Glykosylierung des kürzesten Fragments Erd2.1p zeigt an, dass die erste hydrophobe Einheit ausreicht, um die Verankerung des Proteins in der Membran zu ermöglichen. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem hydrophoben Element also tatsächlich um eine Transmembraneinheit handelt, welche in der *in silico* Analyse von einigen Vorhersage-Algorithmen jedoch nicht als solche erkannt wurde.

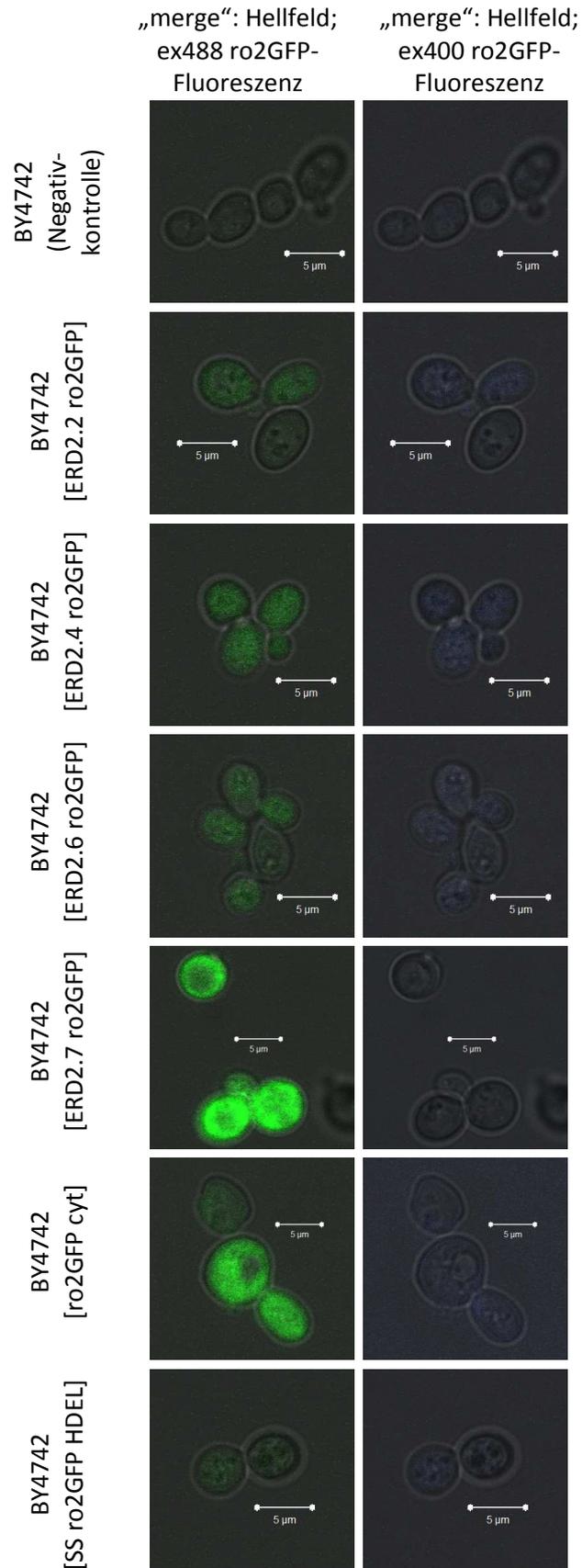
### 2.2.3 *In vivo* Topologie-Analyse von Erd2p über ratiometrische Fluoreszenzmessung

Die dritte in dieser Arbeit angewendete Strategie zur *in vivo* Topologie-Bestimmung basiert auf den Fluoreszenzeigenschaften einer redoxsensitiven GFP-Variante. Herrschen reduzierende Bedingungen, nimmt die Emission bei Anregung von ro2GFP mit Laserlicht einer Wellenlänge von 400 nm zu, während die Emission bei Anregung mit 480 nm sinkt. Bei Oxidation zeigt sich ein entgegengesetztes Anregungsverhalten (Hanson *et al.*, 2004). Diese Dynamik lässt sich nutzen, um die Redoxbedingungen innerhalb der Zelle fluoreszenzmikroskopisch zu bestimmen. Bei ratiometrischen Messungen werden die Emissionen nach Anregung bei 400 bzw. 480 nm detektiert, deren Intensitäten bestimmt und der resultierende Quotient  $ex400/ex480$  ermittelt. Brach und Mitarbeiter nutzten 2008 erstmalig die ratiometrische Fluoreszenzmessung an ro2GFP-Fusionen, um die Topologie eines Membranproteins, des KDEL-Rezeptors aus *Arabidopsis thaliana in vivo* zu bestimmen. Hierzu wurden C-terminale Fusionen von ro2GFP an verkürzte Rezeptor-Varianten eingesetzt, welche die Orientierung von Transmembraneinheiten anzeigten.

Analog zu dieser Vorgehensweise wurde in der vorliegenden Arbeit ro2GFP als Topologiereporter am C-Terminus der bereits beschriebenen, sukzessive verkürzten Erd2p-Fragmente eingesetzt. Das Reporterkonstrukt *ro2GFP* wurde durch PCR mit Hilfe der Primer 5'ro2GFP und 3'ro2GFP hergestellt und über *SpeI* und *BamHI* „in frame“ hinter die verkürzten *ERD2*-Varianten in pJD.6 kloniert. Als Kontrolle für die zytosolische Lokalisation wurde das Konstrukt *ro2GFP<sub>cyt</sub>* mit Hilfe der Primer 5' *XhoI EcoRI* ro2GFP und 3' ro2GFP hergestellt und über *XhoI* und *BamHI* in pJD.6 einkloniert. Als Kontrolle zur ER-Lokalisation wurde eine Variante exprimiert, welche am N-Terminus das Sekretionssignal von Kar2p (SS) trägt und über ein ER-Retentionssignal in Form eines HDEL-Motivs am C-Terminus verfügt. Die Sequenz des Sekretionssignals wurde in zwei PCR-Schritten über die Primer 5' SS I und 5' SS ro2GFP II angefügt. Der 3'Primer ro2GFPHDEL fügte die Sequenz des

Retentionssignals an. Das resultierende Kontrollkonstrukt *SSro2GFPHDEL* wurde über *XhoI* und *BamHI* in pJD.6 inkloniert.

Nach Transformation der Vektoren zur Topologieanalyse und der Expressionsvektoren für die ER- und die Zytosol-Kontrolle wurde die Expression 24 Stunden in Galaktose-haltigem Medium induziert. Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie in Material und Methoden, Punkt 16.2 beschrieben. Als Negativkontrolle wurde der Stamm BY4742 ohne die Expression einer ro2GFP-Variante mitgeführt. In Abbildung 28 sind die bei 500 bis 550 nm detektierten Fluoreszenz-Signale nach Anregung bei 488 nm (ex488) grün und nach Anregung bei 400 nm (ex400) blau als „merge“-Darstellung mit den Hellfeld-Aufnahmen für alle Proben und Kontrollen gezeigt.



**Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahmen nach Expression von *ERD2ro2GFP*-Fusionen zur Topologie-Analyse über ratiometrische Fluoreszenzmessung in *S. cerevisiae*.**

Die Abbildung zeigt die Erd2ro2GFP-Fluoreszenz nach Expression in *S. cerevisiae* BY4742 nach Anregung bei 488 nm bzw. 400 nm. Die „merge“-Darstellungen enthalten die Hellfeldaufnahme und die Fluoreszenzsignale.

Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; detector gain (ex488): 1019; detector gain (ex400): 1035; average 4; scan speed 9; pinhole (ex488): 696 µm; pinhole (ex400): 1000 µm; transmission (ex488): 1 %; transmission (ex400): 17 %; Anregung mit 400 nm erzielt durch Zweiphotonen-Laser „Chameleon“ (800 nm)

Die schwachen Fluoreszenzsignale, insbesondere bei der Anregung bei 400 nm, erlauben keine rein optische Auswertung durch einen einfachen Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen. Daher wurde eine Auswertung der Einzelfluoreszenzen nach Anregung bei 488 bzw. 400 nm durch die Software Zeiss LSM Image Examiner an den unbearbeiteten Aufnahmen aller Proben und Kontrollen durchgeführt.

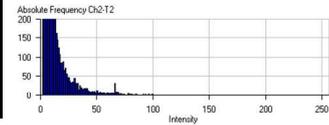
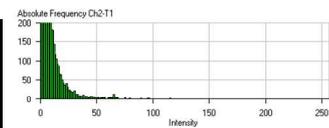
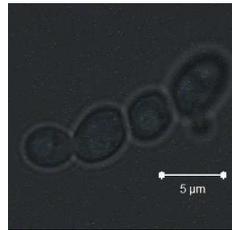
Um die Zellgrenzen zu verdeutlichen, wurde mit „merge“-Bildern gearbeitet, bei denen die Fluoreszenzsignale ex400 und ex488 mit dem Hellfeldbild überlagert wurden. Zunächst wurde der Bildbereich außerhalb der Zellen über die „Mask“-Funktion ausgeblendet. Über die Funktion „Histo“ wurden Intensitätsdiagramme erstellt. Innerhalb des ausgewählten Zell-Bereichs ist die Häufigkeit der Bildpunkte gegen die Fluoreszenzintensität der Emission aufgetragen. In Abbildung 29 sind die resultierenden Diagramme für die Proben nach Expression von *ERD2.2ro2GFP*, *ERD2.4ro2GFP*, *ERD2.6ro2GFP*, *ERD2.7ro2GFP*, *ro2GFPcyt* und *SSro2GFPHDEL* gezeigt. Als Negativkontrolle wurde der Stamm BY4742 ohne Expression eines ro2GFP-Fusionsproteins mitgeführt.

„merge“: Hellfeld;  
ex488 ro2GFP-  
Fluoreszenz; ex400  
ro2GFP-Fluoreszenz

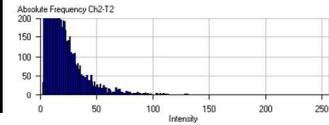
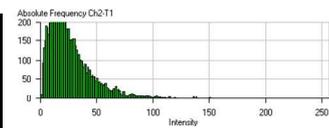
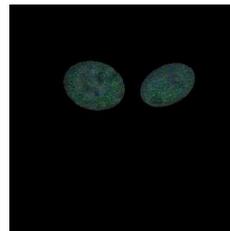
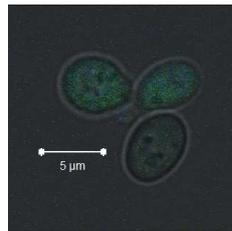
Auswahl der  
Bildbereiche  
über „Mask“

Intensitätsdiagramm ex488  
und ex400 über „Histo“

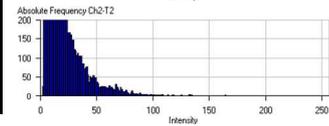
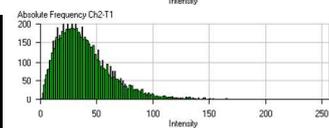
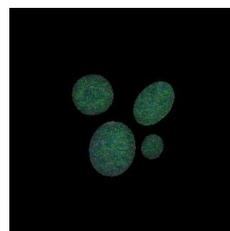
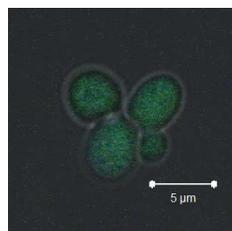
BY4742  
(Negativ-  
kontrolle)



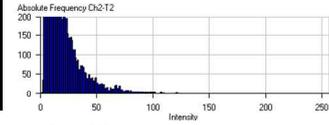
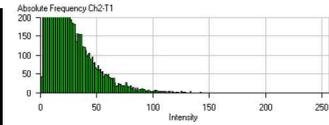
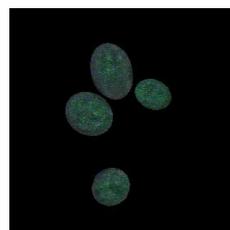
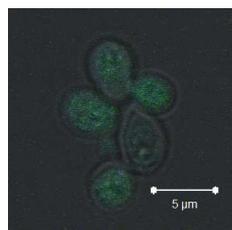
BY4742  
[ERD2.2 ro2GFP]



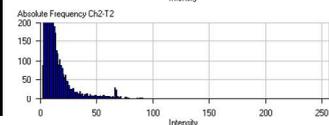
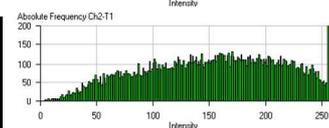
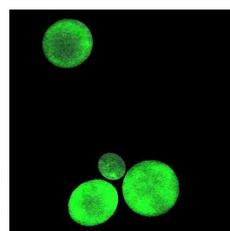
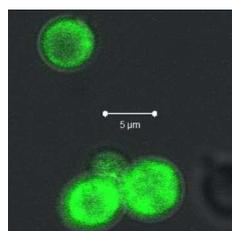
BY4742  
[ERD2.4 ro2GFP]



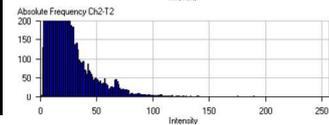
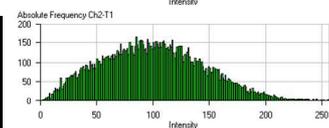
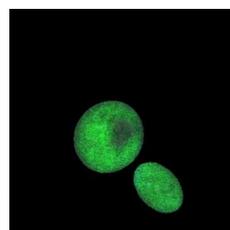
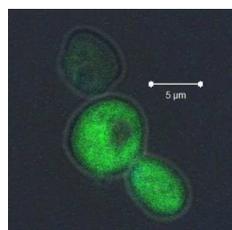
BY4742  
[ERD2.6 ro2GFP]



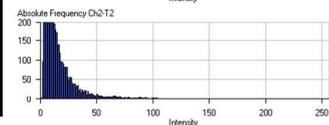
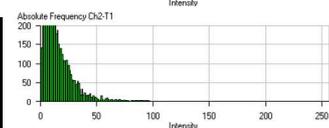
BY4742  
[ERD2.7 ro2GFP]



BY4742  
[ro2GFP cyt]



BY4742  
[SS ro2GFP HDEL]



**Abbildung 29: Intensitätsdigramme an Aufnahmen nach Expression von ERD2ro2GFP-Fusionen in *S. cerevisiae* zur Topologie-Analyse über ratiometrische Fluoreszenzmessung.**

Die Abbildung zeigt die Erd2ro2GFP-Fluoreszenz nach Expression in *S. cerevisiae* BY4742 nach Anregung bei 488 nm und 400 nm in einer „merge“-Darstellungen mit den Hellfeldaufnahmen. Die Auswahl der Bildbereiche innerhalb der Zellgrenzen wurde für jede Aufnahme mit der Funktion „Mask“ festgelegt. In den durch die Funktion „Histo“ erstellten Intensitätsdiagrammen ist die Häufigkeit der Bildpunkte gegen ihre Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; detector gain (ex488): 1019; detector gain (ex400): 1035; average 4; scan speed 9; pinhole (ex488): 696 µm; pinhole (ex400): 1000 µm; transmission (ex488): 1 %; transmission (ex400): 17 %

Auswertung: Zeiss LSM Image Examiner v. 4.2.0.121; Funktionen „Mask“ und „Histo“, Darstellung der Diagramme: Intensitäten für ex488 oben, Intensitäten für ex400 unten

Aus den Intensitätsdiagrammen ist ersichtlich, dass in den Proben nach Expression von *ERD2.7ro2GFP* und nach Expression von zytosolischem ro2GFP im Bereich der Zellen deutlich mehr Bildpunkte mit hoher Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 488 nm detektierbar sind, als in den Aufnahmen von Hefen nach Expression von *ERD2.2ro2GFP*, *ERD2.4ro2GFP*, *ERD2.6ro2GFP* oder der Kontrolle mit der ER-lokalisierten Variante *SSro2GFPHDEL*. Dies bestätigt einen Unterschied in der Orientierung der C-Termini der Fusionsproteine. Die Intensitätsdiagramme nach Anregung bei 400 nm zeigen einen weniger deutlichen Unterschied zwischen den Proben. Genaueren Aufschluss sollten daher die ratiometrischen Fluoreszenzberechnungen des Quotienten aus ex400 und ex488 geben.

Die Berechnung des Quotienten ex400/ex488 basiert auf den durch die Funktion „Statistics“ ermittelten Intensitätsmitteln. Hierzu wurden zunächst von den Mittelwerten der Intensitäten ex400 und ex488 der Proben und Kontrollen für zytosolische und ER-Lokalisation die Intensitätsmittel der Negativkontrolle subtrahiert. Aus den auf diese Weise erhaltenen um Hintergrund- und Autofluoreszenz bereinigten Intensitätswerten wurde der Quotient ex400/ex488 berechnet. Die Intensitätsmittel der Rohdaten nach Expression von *ERD2.2ro2GFP*, *ERD2.4ro2GFP*, *ERD2.6ro2GFP*, *ERD27ro2GFP*, *ro2GFPcyt*, *SSro2GFPHDEL*, der Negativkontrolle sowie die ermittelten Quotienten ex400/ex488 sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Ergebnisse der ratiometrischen Fluoreszenzmessung an *S. cerevisiae* nach Expression von *ERD2ro2GFP*-Derivaten.**

Die Intensitätsmittelwerte wurden an Hefezellen nach Expression von *ERD2.2ro2GFP*, *ERD2.4ro2GFP*, *ERD2.6ro2GFP*, *ERD2.7ro2GFP*, *ro2GFPcyt*, *SSro2GFPHDEL* und an dem wildtypischen Stamm ohne Expression einer GFP-Variante bestimmt. Grundlage der Berechnungen sind die Aufnahmen aus Abbildung 29. Gezeigt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 488 nm (ex488) bzw. nach Anregung bei 400 nm (ex400). Die Mittelwerte wurden anhand der Aufnahmen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software Zeiss LSM Image Examiner ermittelt. Die Bildbereiche innerhalb der Zellen wurden durch die Funktion „Mask“ ausgewählt und die Intensitäten der Bildpunkte mit der Funktion „Histo“ bestimmt. Die Funktion „Statistics“ berechnete die Mittelwerte „mean“ der Fluoreszenzintensitäten und die Standardabweichung  $\sigma$ . Zur Bestimmung des Quotienten ex400/ex488 wurden die Intensitätsmittel der Proben nach Subtraktion der Werte der Negativkontrolle eingesetzt.

	„mean“ ex488	$\sigma$ (ex488)	„mean“ ex400	$\sigma$ (ex400)	ex400/ex488
BY4742 (Negativkontrolle)	5,3	7,4	8,3	9,7	-
BY4742 [ <i>ERD2.2ro2GFP</i> ]	25,7	18,4	19,3	16,3	0,54
BY4742 [ <i>ERD2.4ro2GFP</i> ]	38,6	23,4	21,1	17,3	0,38
BY4742 [ <i>ERD2.6ro2GFP</i> ]	26,2	19,9	17,1	15,1	0,42
BY4742 [ <i>ERD2.7ro2GFP</i> ]	153,4	60,8	5,9	7,2	<0,01
BY4742 [ <i>ro2GFPcyt</i> ]	98,9	44,3	17,0	16,5	0,09
BY4742 [ <i>SSro2GFPHDEL</i> ]	13,8	13,0	12,1	12,2	0,44

Erwartet wurde ein niedriger ex400/ex488-Wert in der reduzierenden Umgebung des Zytosols, während bei ER-Lokalisation des C-terminalen Reporters der Quotient steigen sollte. Der ex400/ex488-Wert liegt für die rein zytosolisch exprimierte Variante *ro2GFPcyt* bei 0,09 und bei Expression der ER-lokaliserten Variante *SSro2GFPHDEL* bei 0,44. Die Werte bei Expression der Fusionen aus den verkürzten *ERD2*-Varianten und *ro2GFP* liegen bei den Varianten *ERD2.2ro2GFP*, *ERD2.4ro2GFP* und *ERD2.6ro2GFP* zwischen 0,38 und 0,54. Diese Varianten besitzen nach dem *in silico* Topologie-Modell einen ER-Luminal orientierten C-Terminus (vgl. Abbildung 23). Die Expression der

*ro2GFP*-Fusion mit der vollständigen *ERD2*-Sequenz (*ERD.7ro2GFP*) lieferte einen *ex400/ex488*-Wert, der mit weniger als 0,01 deutlich unterhalb des Werts der Zytosol-Kontrolle liegt. Aufgrund der insgesamt niedrigen Intensitätswerte für alle Proben und einer recht hohen Standardabweichung lassen sich die Ergebnisse jedoch nur tendenziell beurteilen. So lassen sich die Fusionsproteine *Erd2.2ro2GFP*, *Erd2.4ro2GFP*, *Erd2.6ro2GFP* in die Kategorie eines hohen *ex400/ex488*-Werts zusammenfassen und scheinen daher ebenso wie die Variante *SSro2GFP<sub>HDEL</sub>* mit ihrem C-Terminus im ER lokalisiert zu sein. Ein um den Faktor 4 bis 6 niedrigerer Wert für *ex400/ex488* deutet bei der Expression von *ro2GFP<sub>cyt</sub>* auf die zytosolische Expression hin. Bei der Expression von *ERD2.7ro2GFP* liegt dieser Wert sogar noch niedriger. Diese Ergebnisse der ratiometrischen Fluoreszenzmessung bestätigen die zytosolische Orientierung des C-Terminus von *Erd2p* und die ER-luminale Orientierung des C-Terminus nach Verkürzung auf zwei, vier oder sechs potentielle Transmembransegmente.

Insbesondere aufgrund der sehr niedrigen Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 400 nm, welche im Mittel maximal den 2,5fachen Wert der Negativkontrolle erreichen, sind die Ergebnisse der ratiometrischen Fluoreszenzmessung nur im Zusammenhang mit den beiden bereits beschriebenen Topologie-Analysen zu interpretieren (vgl. Ergebnisse, Punkte 2.2.1 und 2.2.2). Die in der vorliegenden Arbeit experimentell ermittelten Daten aller drei *in vivo* Testsysteme sind in Tabelle 11 zusammengefasst und dem *in silico* Modell gegenübergestellt.

**Tabelle 11: Vergleich des *in silico* Topologie-Modells von Erd2p aus *S. cerevisiae* mit der *in vivo* Topologie-Analyse.**

Die Tabelle stellt die Daten der drei in der Arbeit durchgeführten *in vivo* Topologie-Analysen dem erstellten *in silico* Modell gegenüber. Für die *in silico* Analyse ist die Orientierung des C-Terminus des jeweils letzten hydrophoben Segments angegeben. Die experimentell erhaltenen Daten der *in vivo* Topologie-Analysen und die daraus abgeleitete Orientierung des jeweils letzten hydrophoben Segments sind aufgeführt.

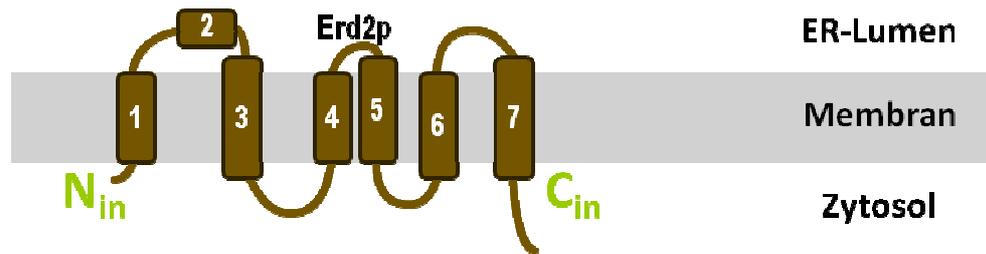
- ↓ zytosolische Orientierung des C-Terminus (N<sub>out</sub> C<sub>in</sub>-Orientierung)
- ↑ ER-luminale Orientierung des C-Terminus (N<sub>in</sub> C<sub>out</sub>)
- + Wachstum bzw. Glykosylierung
- kein Wachstum bzw. keine Glykosylierung
- > hoher ratio-Wert ex400/ex488
- < niedriger ratio-Wert ex400/ex488

Erd2p-Variante	<i>in silico</i> Topologie-Analyse	Wachstumsreporter RAS		Glykosylierungsreporter SUC2AV5		ratiometrische Fluoreszenzmessung (ro2GFP)	
		Wachstum		Glykosyl-zustand		ex400/ex488	
Erd2.1p	↑	-	↑	+	↑	n.d.	
Erd2.2p	↑	-	↑	+	↑	>	↑
Erd2.3p	↓	+	↓	+	↑	n.d.	
Erd2.4p	↑	-	↑	+	↑	>	↑
Erd2.5p	↓	+	↓	-	↓	n.d.	
Erd2.6p	↑	(+)	↓	-	↓	>	↑
Erd2.7p	↓	+	↓	-	↓	<	↓

Werden die experimentellen Daten der drei in dieser Arbeit eingesetzten *in vivo* Topologie-Analysen von Erd2p verglichen, lässt sich das erstellte *in silico* Modell bestätigen. Der C-Terminus des Volllängen-Erd2p, Erd2.7p, ist nach den Ergebnissen aller drei *in vivo* Testsysteme zytosolisch gelegen. Diese Ergebnisse stimmen mit der *in silico* Analyse überein. Die zytosolische Orientierung des N-Terminus leitet sich aus den Ergebnissen der Wachstumstests im RRS her, wonach das Wachstum nicht wiederhergestellt werden konnte. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der im zweiten

Testsystem verifizierten Glykosylierung. Die zweite hydrophobe Einheit wurde im *in silico* Modell ebenfalls als luminal beschrieben. Der Wachstumsdefekt im RRS konnte durch diese Variante nicht überwunden werden, was ebenso wie die nachgewiesene Glykosylierung für eine luminale Orientierung spricht. Die ratiometrische Fluoreszenzanalyse nach Expression dieser verkürzten Variante deutet ebenfalls auf eine ER-luminale Orientierung des C-Terminus hin. Liegt auch die dritte hydrophobe Einheit vor, kann ein positives Signal im RAS-Wachstumstest erzielt werden. Neben der unglykosylierten Form zeigt Erd2.2p mit C-terminalem Reporter SUC2AV5 jedoch auch eine höhermolekulare, glykosylierte Form. In allen drei *in vivo* Testsystemen bestätigte sich jedoch der C-Terminus der vierten hydrophoben Einheit als luminal. Aufgrund der in drei Testsystemen erhaltenen Ergebnisse für die Erd2p-Varianten mit zwei und vier hydrophoben Elementen, deren C-Termini eindeutig eine luminale Orientierung zugewiesen werden konnte, lässt sich der dazwischen liegende dritte hydrophobe Bereich als Transmembraneinheit nur in umgekehrter Richtung integrieren. Der C-Terminus nach dem fünften potentiellen Transmembransegment wurde über RRS und den Glykosylierungsreporter als zytosolisch angezeigt. Die Ergebnisse für Erd2.6p lassen keine eindeutige Zuordnung zu. Jedoch lässt auch hier die verifizierte zum Zytosol gerichtete Insertion der beiden direkt benachbarten Transmembraneinheiten aus Erd2.5p und Erd2.7p nur eine entgegengesetzte, dem ER-Lumen zugewandte Orientierung der sechsten hydrophoben Einheit zu.

Somit ließ sich im Einklang mit der *in silico* Analyse von Erd2p ein *in vivo* Toplogiemodell experimentell untermauern. Diesem Modell entsprechend liegen N- und C-Terminus des HDEL-Rezeptors im Zytoplasma vor. Von den sieben hydrophoben Elementen werden nur sechs als Transmembraneinheiten in die Membran inseriert. Dieses Modell ist in Abbildung 30 schematisch dargestellt.



**Abbildung 30: Topologie-Modell des HDEL-Rezeptors Erd2p in *S. cerevisiae*.**

Die Abbildung zeigt das in dieser Arbeit erstellte Topologie-Modell von Erd2p in schematischer Darstellung mit der Orientierung aller sieben hydrophoben Sequenzbereiche. Dieses Modell basiert auf einer Kombination der *in silico* Sequenzanalyse, des Vergleichs mit der Topologie zweier homologer Rezeptoren und den durch drei *in vivo* Testsysteme erhaltenen experimentellen Daten. Die Analysen identifizieren Erd2p als polytopisches Transmembranprotein mit sechs Transmembrandomänen und zytosolischen N- und C-Termini.

### 3. Untersuchungen zur Funktion von Erd2p bei der Internalisierung des Toxins K28

#### 3.1 Sequenzanalyse von Erd2p auf mögliche Endozytosesignale

Die selektive Endozytose von Plasmamembranrezeptoren setzt eine Erkennung durch Adaptoren voraus, welche die Verbindung der Transportfracht mit der Clathrin-Hülle herstellen (Brodsky *et al.*, 2001). Um Aufschluss über den Mechanismus der Internalisierung des K28/Erdp-Komplexes zu erhalten, sollten in dieser Arbeit zunächst Endozytose motive in der Erd2p-Sequenz identifiziert werden.

Zwei mögliche Signale zur Erkennung des K28/Erd2p-Komplexes sind denkbar. Die Erkennung spezifischer Peptidfolgen als Signalmotive oder die Erkennung einer posttranslationalen Modifikation, der Ubiquitinierung (Polo *et al.*, 2003). In Tabelle 12 sind bekannte Motive aufgeführt, die als Endozytosesignal in Säugern wie auch in Hefe fungieren. Die Erd2p-Sequenz zeigt kein Di-Leucin-basierendes Signal in der klassischen Form [D/E]XXXL[L/I]. Einzig eine Abwandlung in der Sequenzfolge ESVAIL ist erkennbar. Diese Motiv-Variation liegt jedoch zentral in der fünften hydrophoben Domäne des Rezeptors und ist daher für zytosolische Adaptoren nicht zugänglich. Die von Paoluzi und Mitarbeitern (1998) für *S. cerevisiae* beschriebenen Erkennungsmotive FW, WW oder H[T/S]F liegen in Erd2p nicht vor. Ein Tyrosin-basierendes Signal der Form YXXΦ findet sich an fünf Positionen der Erd2p-Sequenz. Die erste Position, Y<sub>48</sub>-L<sub>51</sub>, liegt in einer vermutlich nicht-zytosolischen „loop“-Struktur des Rezeptors und ist damit ebenso wenig zugänglich wie die vermutlich transmembran vorliegenden Motive Y<sub>60</sub>-L<sub>63</sub>, Y<sub>164</sub>-L<sub>167</sub> und Y<sub>198</sub>F<sub>201</sub>. In einem vermutlich zytosolisch orientierten „loop“ befindet sich das YXXΦ-ähnliche Motiv Y<sub>90</sub>-M<sub>94</sub>. Am N-Terminus von Erd2p befindet sich ein NPF-Motiv, für das eine Erkennung durch EH-Domänen von Clathrin-Adaptoren bei der rezeptorvermittelten Endozytose beschrieben ist (Polo *et al.*, 2003). Dieses Motiv liegt zytosolisch orientiert vor. Um den Einfluss dieses Signals auf die Endozytose von K28 durch sensitive Hefen zu untersuchen, wurde in dieser

Arbeit die Funktionalität eines Erd2p-Derivats ohne NPF-Signal überprüft und der Einfluss auf die K28-Sensitivität in *S. cerevisiae* bestimmt.

**Tabelle 12: potentielle Endozytosemotive in der Sequenz des HDEL-Rezeptors Erd2p der Hefe *S. cerevisiae*.**

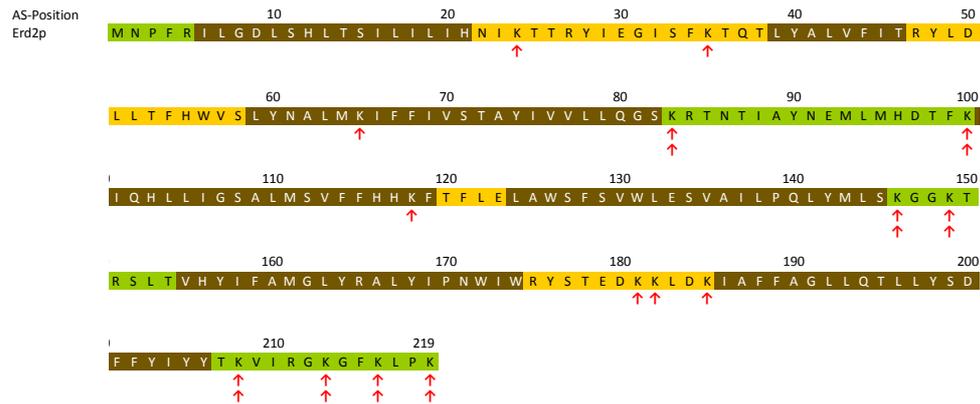
Motive innerhalb der Erd2p-Sequenz, für die eine Beteiligung an der Endozytose von Plasmamembranrezeptoren beschrieben ist, sind in dieser Tabelle aufgelistet.

Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code angegeben; X: beliebige Aminosäure;  $\Phi$ : großer, hydrophober Rest (F, I, L oder M)

Motiv	Referenz	Position in Erd2p
Di-Leucin-basierende Signale: [D/E]XXXL[L/I]	Rapoport <i>et al.</i> , 1998; Kozik <i>et al.</i> , 2010	133-138 (ESVAIL)
FW oder WW	Paoluzi <i>et al.</i> , 1998	-
H[T/S]F	Paoluzi <i>et al.</i> , 1998	-
NPF; NPF <sub>X</sub> (1,2)D	Salcini <i>et al.</i> , 1997; Paoluzi <i>et al.</i> , 1998; Bonifacino und Traub, 2003	2-4 (NPF)
Tyrosin-basierende Signale: YXX $\Phi$	Fölsch <i>et al.</i> , 1999; Boll <i>et al.</i> , 1996	48-51; 60-63; 90-94; 164-167; 198-201
NPXY	Chen <i>et al.</i> , 1990	-

### 3.1.1 Identifikation von Ubiquitinierungsmotiven in Erd2p

Die von Heiligenstein (2008) postulierte Beteiligung von Rsp5p und Clathrin an der Endozytose des Toxin/Rezeptor-Komplexes spricht für ein Ubiquitinierungssignal, das über Clathrin-Adaptoren erkannt werden kann. In der vorliegenden Arbeit sollten Lysinreste identifiziert werden, welche nach einer posttranslationalen Modifikation mit Ubiquitin durch spezifische Adaptoren der Internalisierungsmaschinerie erkannt werden können. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Orientierung der potentiellen Ubiquitinierungsstellen, da nur zytosolische Lysinreste für die Ubiquitinligase Rsp5p zugänglich sind. Die Lysinreste der Erd2p-Sequenz sind in Abbildung 31 markiert und ihre Orientierung zur Membran farbkodiert dargestellt.



**Abbildung 31: Potentielle Ubiquitinierungsstellen in der Erd2p-Sequenz.**

Die Abbildung zeigt die Erd2p-Sequenz in Farbkodierung nach dem erstellten Topologiemodell. Mögliche Ubiquitinierungsstellen sind durch rote Pfeile unterhalb der Sequenzfolge angedeutet. Lysinreste in potentiell zytoplasmatisch orientierten Sequenzbereichen sind mit zwei Pfeilen versehen.

- Transmembran-Einheiten
- zytoplasmatische Bereiche
- nicht-zytoplasmatische Bereiche

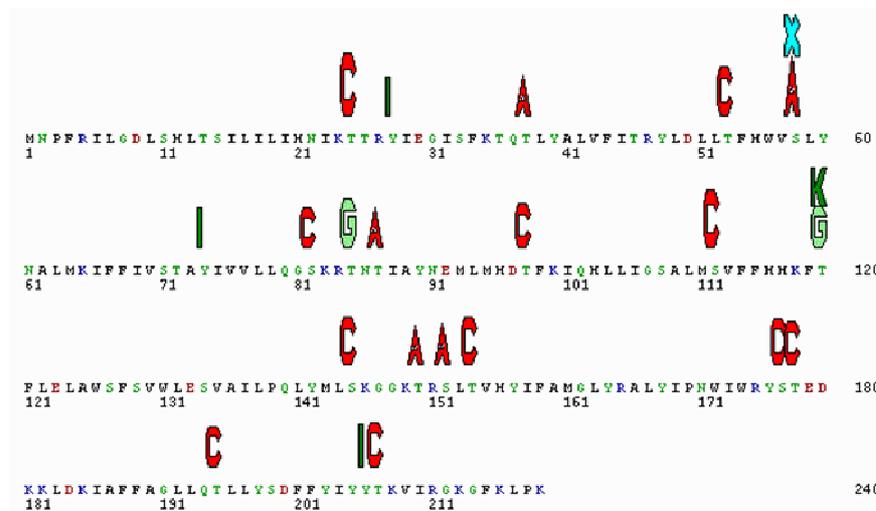
Die Erd2p-Sequenz verfügt über 15 Lysinreste, von denen nach dem erstellten Topologiemodell 8 in zytoplasmatisch orientierten Schleifen bzw. im zytoplasmatischen C-Terminus vorliegen. Die übrigen sieben Lysinreste liegen vermutlich auf der nicht-zytoplasmatischen Membranseite bzw. in membrangängigen Alpha-helices vor und sind somit für die Ubiquitinligase nicht zugänglich. Auffällig sind vier Lysine, die im engen Abstand von nur zwei bzw. vier Aminosäuren im C-Terminus vorliegen. Dieser Sequenzbereich wurde in Analysen zur Funktion des HDEL-Rezeptors näher untersucht (vgl. Punkt 3.2.2).

### 3.1.2 *In silico* Analyse von Erd2p mit NetPhosK 1.0

Die Phosphorylierung an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten ist eine Proteinmodifikation, die als Regulationsmechanismus der Aktivitäten und Affinitäten einzelner Proteine zahlreiche zelluläre Prozesse beeinflusst. Auch bei der Endozytose von Plasmamembranrezeptoren kann ein Phosphorylierungsereignis die Internalisierung steuern. Der für *S. cerevisiae* beschriebene „PURE pathway“ setzt eine Phosphorylierung eines integralen

Plasmamembranproteins voraus, damit eine Ubiquitinierung erfolgen kann, welche den Internalisierungsprozess auslöst (Kelm *et al.*, 2004).

Um in späteren *in vivo* Versuchen den Einfluss einer Phosphorylierung des HDEL-Rezeptors Erd2p auf die Aufnahme von K28 durch Hefezellen untersuchen zu können, sollten zunächst potentielle Phosphorylierungsstellen in der Proteinsequenz identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Erd2p-Sequenz mit Hilfe der „prediction software“ des NetPhosK 1.0 Servers der Technischen Universität von Dänemark (Blom *et al.*, 2004) analysiert. NetPhosK basiert auf einem neuronalen Netzwerk, das den theoretischen Phosphorylierungszustand anhand von Datensets aus experimentell validierten Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen ermittelt. Die Ergebnisse dieser *in silico* Vorhersage sind in Abbildung 32 aufgezeigt.



**Abbildung 32: *In silico* Vorhersage potentieller Phosphorylierungsmotive in Erd2p.**

Die Abbildung zeigt die Vorhersage möglicher Phosphorylierungsmotive für die Erd2p-Sequenz nach NetPhosK 1.0 in Form einer grafischen Darstellung („PMT landscape“). Oberhalb der Sequenz sind die Kinasen angegeben, die an den entsprechenden Positionen Phosphorylierungen katalysieren können.

- A: cAMP-abhängige Proteinkinase
- C: Proteinkinase C
- G: cGMP-abhängige Proteinkinase
- I: Insulinrezeptor-Kinase
- K: Kasein-Kinase II
- X: DNA PK

Die wildtypische Erd2p-Sequenz zeigt 21 potentielle Phosphorylierungsstellen an, deren „score“ oberhalb des Grenzwertes von 0,5 liegt. Von diesen Positionen sind zwölf nach dem unter Punkt 2.1 beschriebenen Topologiemodell nicht zytosolisch orientiert. Da die Phosphorylierung nur im Zytosol katalysiert wird, nicht aber auf der Zelloberfläche, werden nur die zytosolisch vorliegenden potentiellen Phosphorylierungsstellen in Tabelle 13 mit den entsprechenden Kinasen und „scores“ aufgeführt.

**Tabelle 13: Potentielle Phosphorylierungsstellen in Erd2p.**

Aufgelistet sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen in zytosolischen Sequenzbereichen von Erd2p nach *in silico* Vorhersage durch NetPhosK 1.0. Die „scores“ als Richtwerte für die Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung und die entsprechenden Kinasen sind aufgeführt.

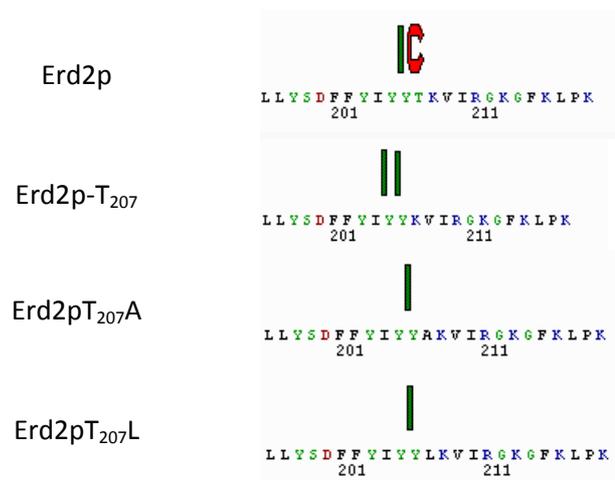
PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase

PKC: Proteinkinase C

Position	Kinase	„score“
S <sub>82</sub>	PKC	0,52
T <sub>87</sub>	PKA	0,53
T <sub>98</sub>	PKC	0,58
T <sub>150</sub>	PKA	0,50
S <sub>152</sub>	PKA	0,55
T <sub>154</sub>	PKC	0,62
T <sub>207</sub>	PKC	0,59

Die durch NetPhosK angezeigten Phosphorylierungsstellen für die Insulinrezeptor-Kinase und für die cGMP-abhängige Proteinkinase sind in der Tabelle nicht berücksichtigt, da für diese Enzyme keine Homologe in *S. cerevisiae* identifiziert sind (*Saccharomyces* Genome Database, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org); Jacinto und Lorberg, 2008). Für die beiden Kinasen PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) und PKC (Proteinkinase C) sind in *S. cerevisiae* Homologe mit hoher Sequenzidentität zu den Kinasen in Säugern bekannt (Toda *et al.*, 1987; Lewin *et al.*, 1990). Somit verbleiben sieben potentielle Phosphorylierungsstellen, die nach dem in dieser Arbeit präsentierten Topologiemodell Angriffspunkte für eine Regulation des Rezeptors darstellen können. In unmittelbarer Nähe zu den vier potentiell ubiquitinierten Lysinresten des C-Terminus von Erd2p liegt der Threoninrest

207 (T<sub>207</sub>), der in Analysen zur Funktion des HDEL-Rezeptors näher untersucht wurde (vgl. Ergebnisse, Punkt 3.2.2). Durch Deletion bzw. Austausch von T<sub>207</sub> nach Alanin oder Leucin sollte der Einfluss dieser potentiellen Phosphorylierungsstelle auf die Funktion von Erd2p bei der Internalisierung des Toxins K28 bestimmt werden. Abbildung 33 zeigt, dass durch Deletion oder Aminosäureaustausch an Position 207 die durch NetPhosK angezeigte Phosphorylierung des C-Terminus durch PKC ausbleibt.



**Abbildung 33: *In silico* Vorhersage potentieller Phosphorylierungsmotive in Erd2p-Varianten ohne Threonin 207.**

Die Abbildung zeigt die Vorhersage möglicher Phosphorylierungsmotive im C-Terminus der drei Erd2p-Varianten Erd2p-T<sub>207</sub>, Erd2pT<sub>207</sub>A und Erd2pT<sub>207</sub>L im Vergleich zur wildtypischen Sequenz nach NetPhosK 1. Oberhalb der Sequenz sind die Kinasen angegeben, die an den entsprechenden Positionen Phosphorylierungen katalysieren können.

- A: cAMP-abhängige Proteinkinase
- C: Proteinkinase C
- G: cGMP-abhängige Proteinkinase
- I: Insulinrezeptor-Kinase
- K: Kasein-Kinase II
- X: DNA PK

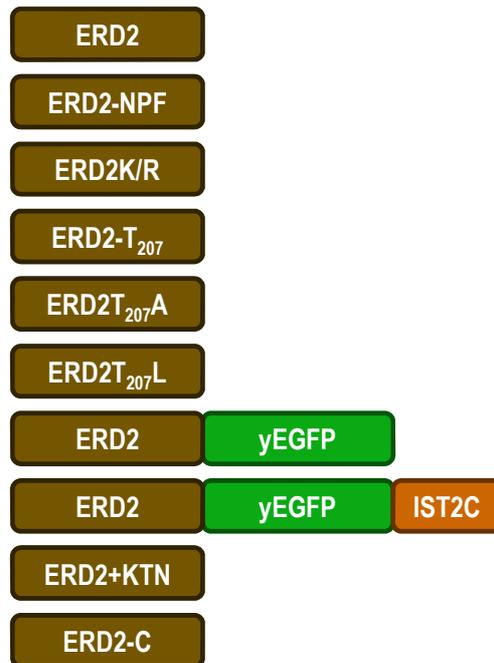
### 3.2 Untersuchungen zur Funktionalität von Erd2p-Varianten ohne Endozytosesignale

Die Arbeiten von Eisfeld und Heiligenstein (2001, 2008) schreiben dem zellulären HDEL-Rezeptor Erd2p nicht nur eine Funktion beim retrograden Transport des Proteintoxins K28 in sensitiven Zielzellen zu, sondern auch eine Beteiligung an der Endozytose des Toxins. Die Internalisierung eines Toxin/Rezeptor-Komplexes setzt Endozytosesignale in zytosolischen Sequenzbereichen des Rezeptors voraus. Solche Endozytose motive werden in Eukaryoten von Adaptoren erkannt, welche wiederum die Verbindung mit Strukturproteinen wie Clathrin ermöglichen. Bei Anlagerung einer Clathrin-Hülle wird die Plasmamembran zur Innenseite eingestülpt. Unter Einsatz weiterer Hilfsproteine wie Dynamin wird ein endozytotisches Vesikel abgeschnürt. Clathrin und AP2-Komponenten, welche den klassischen Komplex zur rezeptorvermittelten Endozytose bilden, wurden bereits als essentielle Komponenten für die Toxizität von K28 in Zielzellen beschrieben (Heiligenstein, 2008; Carroll *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurden potentielle Endozytosesignale identifiziert, welche den Kontakt von Erd2p mit Adaptoren des Clathrin-„coats“ vermitteln können (vgl. Ergebnisse, Punkt 3.1). Diese Motive wurden durch Sequenzanalyse identifiziert. Die Bestätigung der *in vivo* Topologie des Rezeptors (vgl. Ergebnisse, Punkt 2.2) ist die Grundlage für die Beurteilung der Orientierung. Nur die zytosolische Orientierung der Motive stellt ihre Erkennung durch Proteine der Endozytose-Maschinerie sicher.

Am zytosolischen N-Terminus von Erd2p liegt ein NPF-Motiv vor. Für dieses Motiv ist eine  $\beta$ -turn-Struktur beschrieben, welche durch EH-Domänen von Adaptoren erkannt wird und somit während der Rezeptor-Internalisierung die Verbindung an den Clathrin-„coat“ vermittelt (Torrise *et al.*, 1997; deBeer *et al.*, 2000). Der C-Terminus des HDEL-Rezeptors weist einen Sequenzbereich auf, der zahlreiche Lysinreste benachbart zu dem potentiell phosphorylierten Threoninrest 207 enthält. Nach dem Modell des in Hefe beschriebenen PURE-pathways könnte der C-Terminus die Endozytose über eine Phosphorylierungs-/Ubiquitinierungsabfolge einleiten (Kelm *et al.*, 2004).

Um den Einfluss der Endozytosesignale zu untersuchen, wurden Rezeptorvarianten hergestellt, denen jeweils eines der identifizierten Motive fehlte (vgl. Abbildung 34). Diese Varianten sollten im Folgenden auf ihre Funktionalität und auf einen möglichen Einfluss auf die Internalisierung von K28 analysiert werden. Abbildung 34 zeigt in schematischer Darstellung die in dieser Arbeit hergestellten *ERD2*-Derivate, welche auf ihre Funktionalität und ihren Einfluss auf die K28-Sensitivität untersucht wurden. Die wildtypische Sequenz *ERD2* ohne Intron wurde mit Hilfe der Primer 5' *ERD2* und 3' *ERD2* an der wildtypischen *ERD2*-Sequenz aus pYSC2 amplifiziert. Das Amplifikat diente als „template“ zur Herstellung von *ERD2-NPF*, wobei die kodierende Sequenz des N-terminalen NPF-Motivs durch Einsatz des Primers 5' *ERD2-NPF* deletiert wurde. Um eine im C-Terminus lysinfreie *Erd2p*-Variante untersuchen zu können, wurde das *ERD2*-Derivat *ERD2K/R* mit Hilfe des Primers 3' *ERD2K/R* an der *ERD2*-Sequenz amplifiziert. Dieser Primer führte einen gezielten Basenaustausch in vier Codons ein, so dass der C-Terminus des Genprodukts die Modifikationen K<sub>208</sub>R K<sub>213</sub>R K<sub>216</sub>R K<sub>219</sub>R erhielt. Um den Einfluss einer potentiellen Phosphorylierung an dem C-terminalen Threoninrest 207 bestimmen zu können, wurden drei weitere *ERD2*-Derivate hergestellt. Eine Deletion des Codons für Threonin 207 wurde durch den Primer 3' *ERD2-T<sub>207</sub>* eingeführt, während über 3' *ERD2T<sub>207</sub>A* und 3' *ERD2T<sub>207</sub>L* an dieser Position des Genprodukts ein Aminosäureaustausch von Threonin nach Alanin bzw. Leucin bewirkt wurde. In dem *ERD2*-Derivat *ERD2-C* wurde der gesamte Sequenzbereich des C-Terminus nach der letzten Transmembraneinheit deletiert, um gleichzeitig den Einfluss der Lysinreste und von Thr<sub>207</sub> ausschalten zu können. Das Genprodukt der durch 5' *ERD2* und 3' *ERD2+KTN* erstellten Variante *ERD2+KTN* weist ein zusätzlich angefügtes ER-Retentionssignal für Membranproteine des „KKXX“-Typs auf. Alle *ERD2*-Derivate wurden in pSTBlue-1 zwischenkloniert, sequenziert und in pJD.5 inkloniert (vgl. Material und Methoden, Punkt 2.1.4). Die in Abbildung 34 aufgeführten *ERD2EGFP*-Varianten wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (vgl. Ergebnisse, Punkt 1.1.1) und in pJD.5 inkloniert.



**Abbildung 34: Schematische Darstellung der zur Untersuchung der Erd2p-Funktion eingesetzten ERD2-Derivate.**

Die Abbildung zeigt ERD2-Varianten, die in dieser Arbeit auf ihre Funktionalität untersucht wurden. Die wildtypische ERD2-Sequenz enthält das für Erd2p kodierende Strukturgen ohne die Intronsequenz. In dem Derivat ERD2-NPF sind die für das N-terminale NPF-Motiv kodierenden drei Codons deletiert. Das C-terminal lysinfreie Genprodukt des Derivats ERD2K/R weist an den Positionen 208, 213, 216, 219 den Aminosäure-Austausch Lysin nach Arginin auf. In ERD2-T<sub>207</sub> ist das Codon für das potentiell phosphorylierte Threonin 207 deletiert. An dieser Position wurde in den Varianten ERD2T<sub>207</sub>A und ERD2T<sub>207</sub>L ein Austausch nach Alanin bzw. Leucin eingeführt. Die Variante ERD2-C weist eine vollständige Deletion des C-Terminus nach dem letzten potentiellen Transmembransegment auf. Parallel zu den beschriebenen ERD2-Derivaten ohne Endozytosesignale wurden zwei ERD2GFP-Varianten auf ihre Funktionalität getestet. ERD2yEGFP besteht aus einer Fusion des wildtypischen ERD2 mit yEGFP. Durch das Anfügen der IST2C-Sequenz entstand die Variante ERD2yEGFP<sub>IST2C</sub>, deren Genprodukt eine zur Zellperipherie verschobene Lokalisation aufweist.

### 3.2.1 Stammkonstruktion zur funktionellen Untersuchung von Erd2p-Varianten

Um den Endozytose-Mechanismus, der den K28 Toxin/Rezeptor-Komplex zur Internalisierung bringt näher zu charakterisieren, sollten in der vorliegenden Arbeit Erd2p-Varianten ohne die potentiellen Endozytosesignale zum Einsatz kommen. Es galt, den Einfluss von wildtypischem Erd2p auszuschalten, so dass die Internalisierung von K28 einzig auf den mutierten Erd2p-Varianten beruht. Da es sich bei Erd2p um ein essentielles Protein handelt, standen keine klassischen „knock out“-Mechanismen zu Verfügung. Der Einsatz einer

temperatursensitiven Mutante ermöglichte die Validierung der Funktionalität der Erd2p-Derivate. In diesem System konnten jedoch aufgrund der Instabilität des K28-Toxins bei der restriktiven Temperatur von 37°C keine Sensitivitätstests durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund mussten geeignete *S. cerevisiae* Stämme konstruiert werden, welche die Expression von *ERD2*-Derivaten in Hefe ohne Vorhandensein einer wildtypischen *ERD2*-Kopie ermöglichen. Bei den ersten Untersuchungen zur *ERD2*-Funktion machten Semenza und Mitarbeiter (1990) Gebrauch von dem *S. cerevisiae* Stamm YA12. Das wildtypische *ERD2* wurde deletiert, das Überleben des Stamms beruht auf der Überexpression des *SED*-Gens *SEC12* über das Plasmid pYA12, das die *ERD2*-Deletion kompensieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde YA12 als Ausgangsstamm verwendet, um durch Einbringen der *ERD2*-Derivate und anschließende Eliminierung des *SEC12*-Plasmids Stämme zu konstruieren, die einzig eines der *ERD2*-Derivate exprimieren und keine wildtypische *ERD2*-Kopie besitzen. Der Wachstumsdefekt von *erd2*-Deletionsmutanten beruht auf der Verfügbarkeit des Retentionsrezeptors Erd2p. Townsley und Mitarbeiter zeigten, dass sich das System nicht nur durch HDEL-Peptide absättigen lässt, sondern dass auch die Reduktion der Rezeptor-Kopien durch Expression über einen Centromer-Vektor das Wachstum beeinträchtigt ist (Townsley *et al.*, 1994). Aus diesem Grunde musste zur Funktionalitätsanalyse auf „multi-copy“-Vektoren zur Expression der *ERD2*-Varianten zurückgegriffen werden. Die Wahl fiel auf den 2 $\mu$ -Expressionsvektor pESC-LEU. Die *ERD2*-Varianten wurden als *Apal/Sacl*-Fragmente aus pJD.5 mit der *P<sub>GAL1</sub>*-Promotor- und der *CYC1*-Terminator-Sequenz in pESC-LEU integriert. Dabei wurden die beiden pESC-LEU-eigenen Promotoren *P<sub>GAL1</sub>* und *P<sub>GAL10</sub>* sowie die beiden „multiple cloning sites“ ersetzt. Die resultierenden Expressionsvektoren werden als pJD.1-Derivate bezeichnet (vgl. Material und Methoden, Punkt 2.1.6). Nach Transformation in YA12 wurde durch FOA-Selektion das *URA3*-Plasmid pYA12 eliminiert. 5-Fluororotsäure (FOA) wird durch das *URA3*-Genprodukt zu toxischem 5-Fluoruracil umgesetzt. Zur Selektion wurden leu d/o Galaktose-Agarplatten mit 0,1% FOA eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde der Selektionsdruck

auf das *LEU2*-Plasmid pJD.1 aufrecht erhalten, während der Verlust des *URA3*-Plasmids pYA12 begünstigt wurde. Ein Wachstum der Transformanden auf FOA-Agar verifiziert also die Funktionalität der jeweiligen *ERD2*-Variante. Die Ergebnisse der Selektion sind in Tabelle 14 aufgeführt.

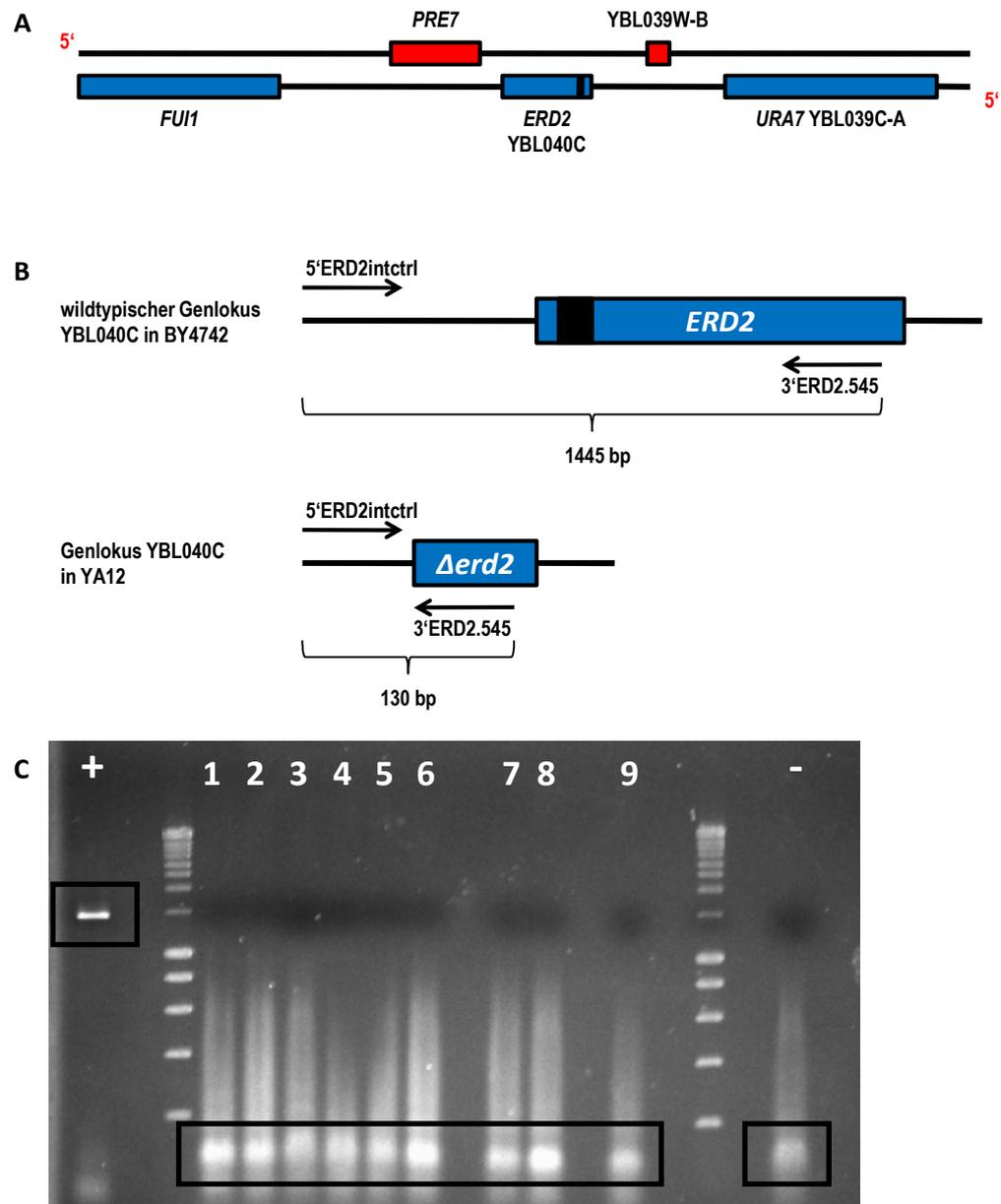
**Tabelle 14: Funktionalitätstest an *ERD2*-Varianten.**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Wachstumstests der  $\Delta$ *erd2*-Transformanden (YA12) auf FOA-Selektions-Agar. Ein Wachstum (+) bestätigt die Funktionalität der *ERD2*-Variante. Konnte der Wachstumsdefekt durch die exprimierte *ERD2*-Variante nicht kompensiert werden (-), liegt keine Funktionalität des *ERD2*-Derivats vor.

<i>ERD2</i> -Genotyp	Wachstum auf FOA-Agar
$\Delta$ <i>erd2</i>	-
<i>ERD2</i>	+
<i>ERD2-NPF</i>	+
<i>ERD2KR</i>	+
<i>ERD-T<sub>207</sub></i>	+
<i>ERDT<sub>207L</sub></i>	+
<i>ERDT<sub>207A</sub></i>	+
<i>ERD2yEGFP</i>	+
<i>ERD2yEGFP<sub>IST2C</sub></i>	+
<i>ERD2+KTN</i>	+
<i>ERD2-C</i>	-

Erkennbar ist, dass alle Varianten ohne potentielle Endozytosemotive den Wachstumsdefekt der *erd2*-Deletionsmutante aufheben können, während eine Deletion des C-Terminus unmittelbar nach dem letzten Transmembransegment die Funktionalität des Rezeptors zerstört. Als Positivkontrolle diente das wildtypische *ERD2*-Gen ohne Intron. Ein Leervektor mit *LEU2*-Plasmid wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Durch FOA-Selektion wurde auch die Funktionalität der zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten GFP-markierten *Erd2p*-Variante *Erd2EGFP* und der beiden Rezeptor-Varianten mit zusätzlichen Transportsignalen *Erd2EGFP<sub>IST2C</sub>* und *Erd2p+KTN* bestätigt.

Der Verlust des YA12-Plasmids konnte durch Wachstumstests der selektierten Stämme auf *ura leu d/o* Agar verifiziert werden. Durch PCR-Analysen wurde der chromosomale *Δerd2*-Status validiert. Hierzu wurde die genomische DNA isoliert und das Bandenmuster nach PCR mit den Primern 5'ERD2intctrl und 3'ERD2.545 gelelektrophoretisch überprüft. In YA12 ist am Genlokus YBL040c ein 1315 bp großes *NcoI*-Fragment zwischen den Positionen -739 in der 5' UTR von *ERD2* und 576 im *ERD2*-Strukturgen deletiert. Wie in Abbildung 35 schematisch dargestellt, bindet der 5'Primer 5' ERD2intctrl unmittelbar vor der Deletionsstelle und der 3'Primer 3' ERD2.546 unmittelbar hinter der Deletionsstelle. Bei wildtypischer Genkonstellation entsteht durch PCR-Amplifikation an chromosomaler DNA (gezeigt an BY4742) mit diesem Primerpaar ein Amplifikat von 1445 bp. Im Stamm YA12 ist durch die Deletion im Bereich der 5'UTR, des 5'Exons, des Introns und eines Großteils des 3'Exons das Amplifikat auf eine Größe von 130 bp verkürzt. Dieses verkürzte PCR-Produkt ist bei allen konstruierten Stämmen erkennbar. Die verifizierten Stämme zur Plasmid-getriebenen Expression der *ERD2*-Varianten ohne chromosomale *ERD2*-Kopie werden im Folgenden als YA ERD2, YA ERD2-NPF, YA ERD2K/R, YA ERD2-T<sub>207</sub>, YA ERD2T<sub>207</sub>A, YA ERD2T<sub>207</sub>L, YA ERD2EGFP, YA ERD2EGFPIST2C und YA ERD2+KTN bezeichnet.



**Abbildung 35: PCR-Analyse der chromosomalen Genkonstellation am Locus YBL040c in *erd2*-Deletionsstämmen.**

**(A) Wildtypische Genkonstellation am Locus YBL040C.** *ERD2* liegt in *S. cerevisiae* auf dem Crick-Strang von Chromosom II und besitzt ein Intron (schematische Darstellung nach [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

**(B) PCR-Analyse.** Mit den Primern 5'ERD2intctrl und 3'ERD2.545 wird bei wildtypischer Genkonstellation ein Produkt von 1445 bp erhalten. Durch die Deletion von 1315 bp im 5'UTR-Bereich bis zum 3' Bereich des ORF von *ERD2* wird ein Produkt von 130 bp amplifiziert.

**(C) Ergebnisse der PCR-Analyse an *erd2*-Deletionsstämmen.** Nach FOA-Selektion wurden die Stämme YA ERD2, YA ERD2-NPF, YA ERD2K/R, YA ERD2-T<sub>207</sub>, YA ERD2T<sub>207</sub>A, YA ERD2T<sub>207</sub>L, YA ERD2EGFP, YA ERD2EGFPIST2C und YA ERD2+KTN auf die chromosomale Deletion überprüft (1-9). Als Kontrolle wurde die chromosomale DNA des Stamms BY4742 mit wildtypischer Genkonstellation (+) und die der  $\Delta$ *erd2*-Mutante (-) mitgeführt.

In den durchgeführten Funktionalitätstests konnte bestätigt werden, dass die in den Lokalisationsstudien eingesetzten *ERD2GFP*-Derivate funktionell sind. Ferner wurde gezeigt, dass sich die Deletion einzelner Endozytose motive nicht auf die Funktionalität des Rezeptors als Komponente des ER-Retentionssystems auswirkt. Weder das N-terminale NPF-Motiv, noch die C-terminalen Lysinreste 208, 213, 216 und 219 oder das C-terminale Threonin 207 sind essentiell. Der Gesamtheit des zytosolischen C-Terminus kommt jedoch eine essentielle Funktion zu, so dass beim Verlust dieser Domäne die Lebensfähigkeit beeinträchtigt ist.

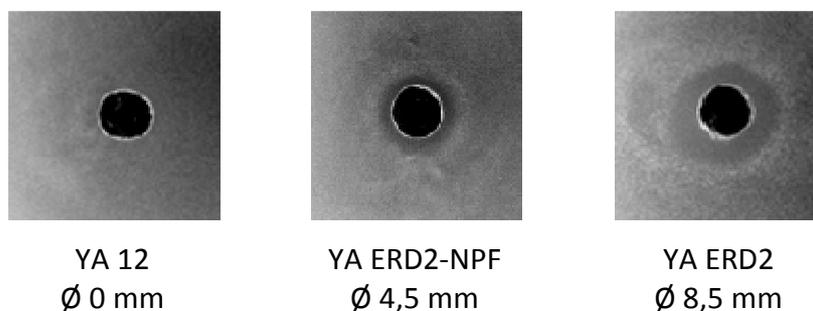
Die hergestellten Stämme YA ERD2, YA ERD2-NPF, YA ERD2K/R, YA ERD2-T<sub>207</sub>, YA ERD2T<sub>207</sub>A, YA ERD2T<sub>207</sub>L, YA ERD2EGFP, YA ERD2EGFP<sub>IST2C</sub> und YA ERD2+KTN erlauben eine Expression eines *ERD2*-Derivats im Stammhintergrund einer *erd2*-Deletionsmutante. Im Folgenden sollte nun in diesen Hefestämmen ein Einfluss der *ERD2*-Varianten auf die Sensitivität gegenüber dem Toxin K28 untersucht werden.

### **3.2.2 Einfluss verschiedener Erd2p-Varianten auf die K28-Sensitivität von *S. cerevisiae***

An lebenden Hefezellen wurde mit Hilfe von Agardiffusionstests der Einfluss von *ERD2*-Varianten auf die K28-Sensitivität bestimmt. Das wildtypische K28-Toxin des Produzenten-Stamms MS300b wurde in zehnfacher Konzentration eingesetzt. Die in dieser Arbeit konstruierten *S. cerevisiae* Stämme ohne chromosomale *ERD2*-Kopie mit plasmidtriebener Expression der *ERD2*-Derivate wurden unter induzierenden Bedingungen in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar (pH 4,7) eingebettet. Als Kenngröße der K28-Sensitivität wurde der Hemmhofdurchmesser herangezogen. Die Ergebnisse der Sensitivitätstests werden im Folgenden dargestellt und sind abschließend in Tabelle 15 aufgeführt.

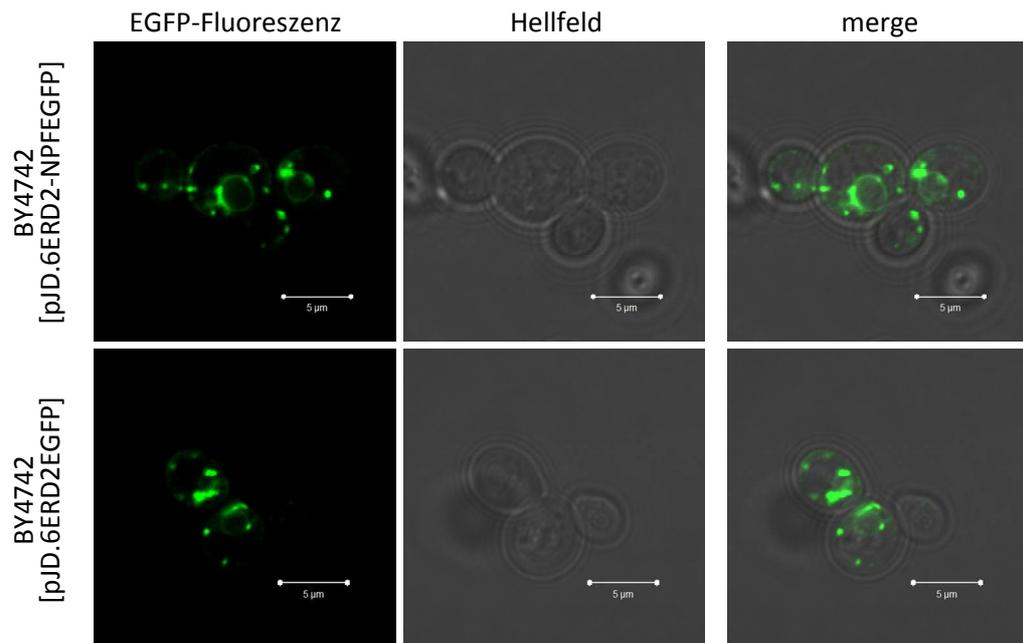
### 3.2.2.1 Einfluss des N-terminalen NPF-Signals von Erd2p

Am N-Terminus von Erd2p wurde das potentielle Endozytosesignal NPF indentifiziert. An dem Hefestamm YA ERD2-NPF mit Expression einer Erd2p-Variante, deren NPF-Motiv vollständig deletiert ist, sollte der Einfluss dieses Signals auf die K28-Sensitivität von Hefezellen untersucht werden. Abbildung 36 zeigt den Methylenblau-Agardiffusionstest an YA ERD2-NPF im Vergleich zu YA *ERD2*, dem Hefestamm der plasmidgetriebener Expression von wildtypischem *ERD2*. Die Größe des Hemmhofs, innerhalb dessen das K28-Toxinkonzentrat die eingebetteten Zellen abtötet, dient als Maß für die Sensitivität des eingebetteten *S. cerevisiae* Stamms. Der Verlust des NPF-Signals führt zu einer deutlichen Reduktion des Hemmhofs von 8,5 mm auf 4,5 mm im Vergleich zur Expression von wildtypischem *ERD2*. Dieses Ergebnis bestätigt, dass das NPF-Signal von Erd2p eine relevante Rolle bei der Toxizitätsvermittlung von K28 spielt. Der Verlust dieses Signals wirkt sich nicht auf die Lokalisation des HDEL-Rezeptors aus, wie an der Expression einer *ERD2GFP*-Fusion ohne NPF-Motiv gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 36: Agardiffusionstest zur Untersuchung der K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression einer *ERD2*-Varinate ohne NPF-Signal.**

Die Abbildung zeigt die Agardiffusionstests an einem *S. cerevisiae* Stamm nach Expression von Erd2p ohne das N-terminale NPF-Signal. Als Positivkontrolle wurde der Stamm YA ERD2 mitgeführt, welcher wildtypisches Erd2p exprimiert. Beide Stämme besitzen kein chromosomales *ERD2*. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um die K28-resistente  $\Delta$ *erd2*-Mutante ohne *ERD2*-Kopie, deren Lebensfähigkeit durch eine *SEC12*-Überexpression garantiert wird. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] der in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar eingebetteten Stämme wurde nach 5 Tagen bestimmt und dient als Maß für die K28-Sensitivität.



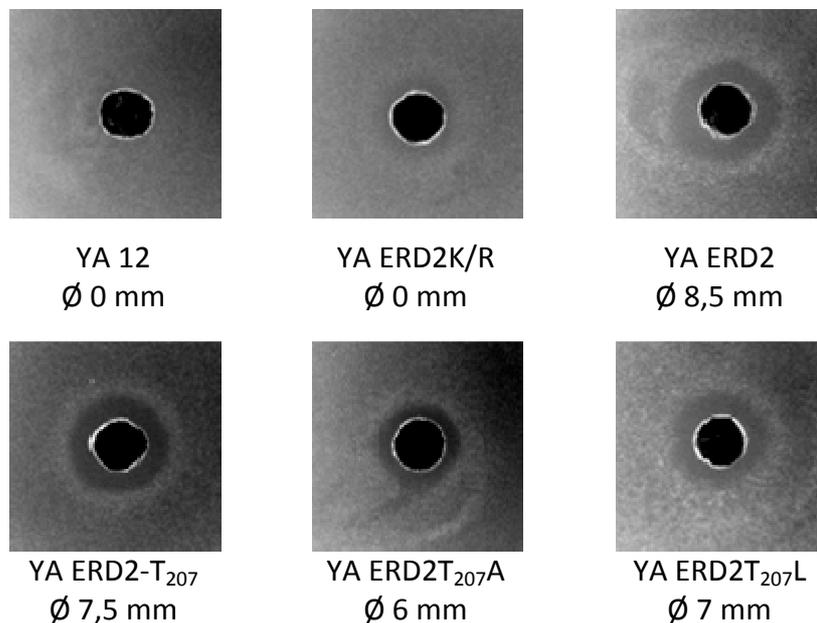
**Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer GFP-markierten Erd2p-Variante ohne N-terminales NPF-Signal.**

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt das Expressionsmuster von Erd2-NPFEgFP im Vergleich zu Erd2EGFP in *S. cerevisiae* BY4742. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; detector gain: 772; average 8; scan speed 7; pinhole 200 µm; transmission 3,2%

### 3.2.2.2 Einfluss des C-terminalen Lysin-Clusters und des potentiell phosphorylierten Threoninrests von Erd2p

Am C-Terminus von Erd2p wurde ein potentielles Endozytosemotiv aus vier Lysinresten und einem potentiell phosphorylierten Threoninrest identifiziert. Diese Sequenzfolge könnte für eine Internalisierung des K28-Toxin/Rezeptor-Komplexes über den PURE-Transportweg notwendig sein. An dem Hefestamm YA ERD2K/R mit Expression einer Erd2p-Variante, deren C-terminale Lysinreste gegen Argininreste ausgetauscht sind, sollte der Einfluss einer möglichen Ubiquitinierung von Erd2p auf die Sensitivität von Hefezellen gegen von außen zugegebenes K28-Toxin untersucht werden. Den Varianten *ERD2-T<sub>207</sub>*, *ERD2T<sub>207</sub>A* und *ERD2T<sub>207</sub>L* fehlt das C-terminale Phosphorylierungssignal. An diesen Varianten sollte der Einfluss einer C-terminalen Phosphorylierung von Erd2p auf die Sensitivität gegen K28 untersucht werden. Abbildung 38 zeigt den Methyleneblau-Agardiffusionstest an YA ERD2K/R, YA ERD2T<sub>207</sub>A und

YA ERD2T<sub>207</sub>L im Vergleich zu YA ERD2, dem Hefestamm mit Expression von wildtypischem *ERD2*.

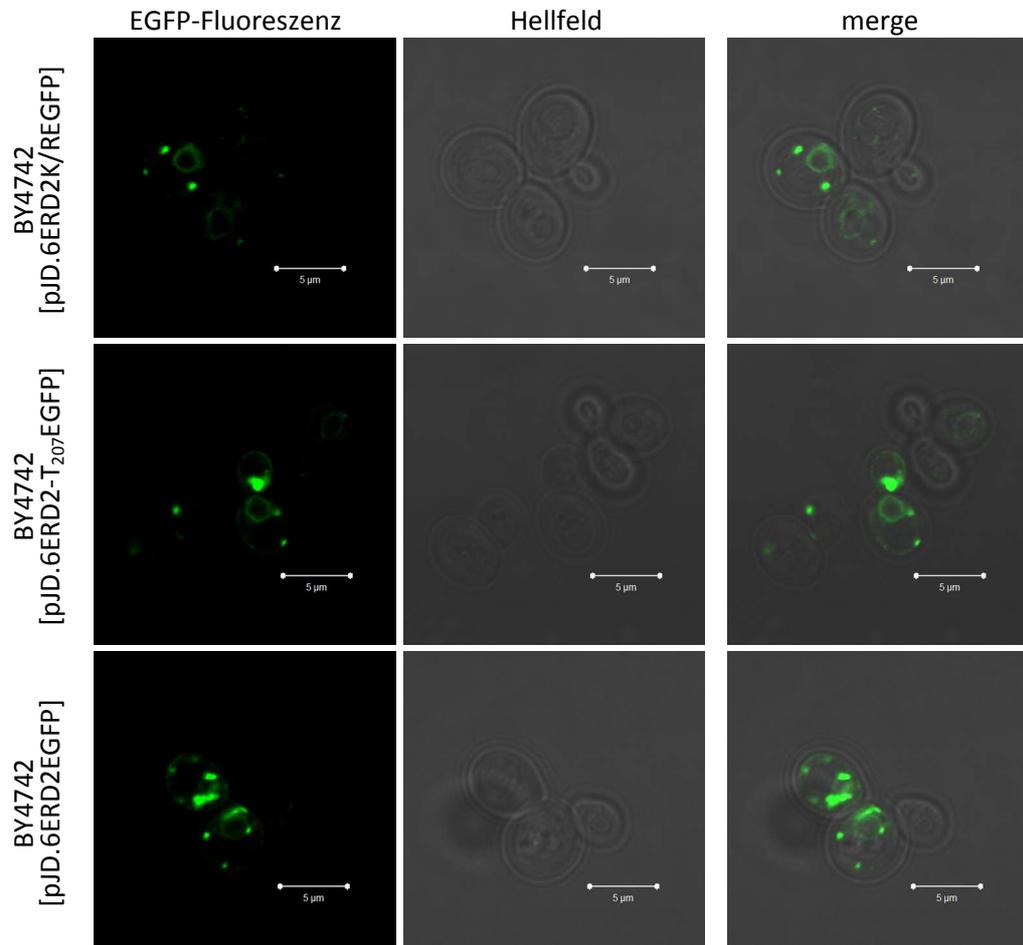


**Abbildung 38: Agardiffusionstest zur Untersuchung der K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression von *ERD2*-Derivaten ohne C-terminale Endozytosemotive.**

Die K28-Sensitivität wurde in Agardiffusionstests an *S. cerevisiae* Stämmen nach Expression von Erd2p-Varianten ohne C-terminale Lysinreste bzw. ohne das potentiell phosphorylierte Threonin 207 bestimmt. Das Genprodukt der Variante *ERD2K/R* weist an den Positionen 208, 213, 216 und 219 Austausch von Lysin nach Arginin auf. In *ERD2-T<sub>207</sub>* liegt eine Deletion an Position T<sub>207</sub> vor, bei *ERD2T<sub>207</sub>A* bzw. *ERD2T<sub>207</sub>L* ein Threonin-Austausch gegen Alanin bzw. Leucin. Zum Vergleich ist der Sensitivitätstest an YA ERD2 (Expression einer wildtypischen *ERD2*-Kopie) und an YA12 ( $\Delta$ *erd2*) gezeigt. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [Ø] der in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar eingebetteten Stämme wurde nach 5 Tagen bestimmt und dient als Maß für die K28-Sensitivität.

Der Verlust des Ubiquitinierungsmotivs am C-Terminus führt zu einem vollständigen Sensitivitätsverlust. Dieses Ergebnis bestätigt, dass einer Ubiquitinierung von Erd2p am C-Terminus eine essentielle Rolle bei der Toxizitätsvermittlung von K28 zukommt. Wenn auch der Sensitivitätsverlust nach Deletion oder Austausch von T<sub>207</sub> gegen Alanin oder Leucin sich weniger deutlich auswirkt als der Verlust der Lysinreste, beeinträchtigt auch der Verlust des Phosphorylierungssignals die K28-Sensitivität. Diese Ergebnisse an Erd2p-Varianten ohne Ubiquitinierungs- und Phosphorylierungsmotiv am C-Terminus sprechen für eine Internalisierung von Erd2p nach dem Modell

des PURE-Transportwegs. Die zelluläre Lokalisation des Rezeptors ist durch Verlust der Signale nicht verändert, wie im Vergleich der Expressionsmuster von *ERD2K/REGFP* bzw. *ERD2-T<sub>207</sub>EGFP* zu *ERD2EGFP* gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 39).

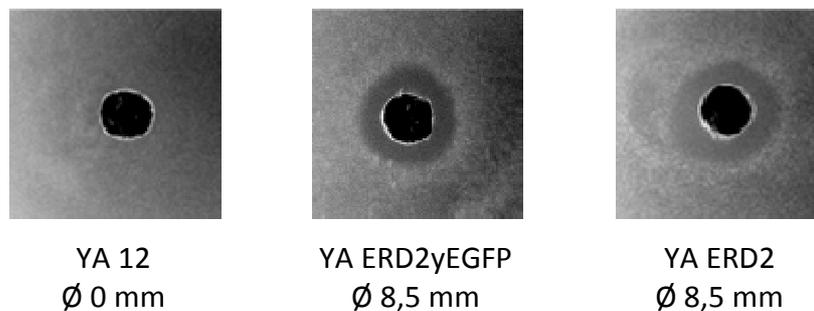


**Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer GFP-markierten Erd2p-Variante ohne C-terminale Lysinreste bzw. ohne Threonin 207.**

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die zelluläre Verteilung von Erd2K/REGFP bzw. Erd2-T<sub>207</sub>EGFP im Vergleich zu Erd2EGFP in *S. cerevisiae* BY4742. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; Messbalken: 5 µm; detector gain: 772; average 8; scan speed 7; pinhole 200 µm; transmission 3,2%

### 3.2.2.3 Einfluss einer GFP-Markierung von Erd2p

In Funktionalitätstests wurde bereits bestätigt, dass die C-terminale Fusion von EGFP an Erd2p nicht zu einem Funktionsverlust des Rezeptors führt. In Agardiffusionstests sollte nun bestätigt werden, dass die Fluoreszenzmarkierung auch keinen Einfluss auf die K28-Sensitivität in *S. cerevisiae* hat. Der Stamm YA ERD2yEGFP wurde daher im Vergleich zur Expression von wildtypischem *ERD2* im Methylenblau-Agardiffusionstest untersucht. Abbildung 40 zeigt, dass die Hemmhofgröße unverändert bleibt. Somit konnte gezeigt werden, dass die K28-Internalisierung und der intrazelluläre Transport des Toxins durch die GFP-Markierung des HDEL-Rezeptors nicht gestört sind.



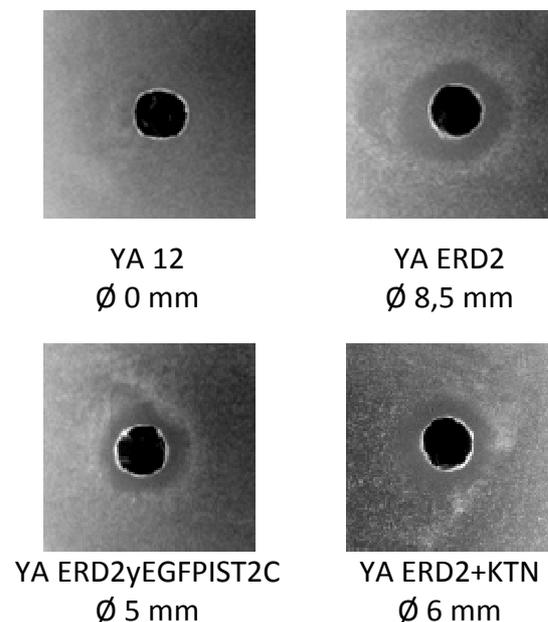
**Abbildung 40: Agardiffusionstest zur Untersuchung der K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression einer *ERD2EGFP*-Fusion.**

Die K28-Sensitivität wurde in Agardiffusionstests an *S. cerevisiae* Stämmen nach Expression einer C-terminal GFP-markierten Erd2p-Variante bestimmt. Zum Vergleich ist der Sensitivitätstest an YA ERD2 (Expression einer wildtypischen *ERD2*-Kopie) und an YA12 ( $\Delta$ *erd2*) gezeigt. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [ $\emptyset$ ] der in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar eingebetteten Stämme wurde nach 5 Tagen bestimmt und dient als Maß für die K28-Sensitivität.

### 3.2.2.4 Einfluss von Erd2p-Varianten mit zusätzlichen Transport-Signalen

Durch das Anfügen des Transport-Signals von Ist2p an den HDEL-Rezeptor wurde bereits in Kollisionsstudien gezeigt, dass eine fast vollständige Lokalisation im Zellgrenzbereich erzielt werden kann. Der auf diese Weise modifizierte Rezeptor ist jedoch immer noch in der Lage, die *erd2*-Deletion zu kompensieren. Ob die veränderte Lokalisation sich auf die K28-Sensitivität auswirkt, sollte in Methylenblau-Agardiffusionstests untersucht werden. Durch die Variante *ERD2+KTN* wird ein HDEL-Rezeptor kodiert, der über ein

C-terminales ER-Retentionsmotiv des „KKXX“-Typs verfügt. Es galt nun zu bestätigen, dass die verstärkte Retention des Rezeptors im ER eine verminderte Kopienzahl an der Plasmamembran zur Folge hat, was sich in einem K28-Sensitivitätsverlust zeigen sollte. Abbildung 41 zeigt, dass nach Expression von *ERD2yEGFP**IST2C* bzw. *ERD2+KTN* die Hemmhofgröße im Vergleich zur Expression von wildtypischem *ERD2* deutlich reduziert ist. Beide zusätzlich angefügten Transportsignale führen demnach zu einer verminderten Sensitivität gegen das Toxin K28.



**Abbildung 41: Agardiffusionstest zur Untersuchung der K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression von *ERD2*-Derivaten mit zusätzlichen Transportsignalen.**

Die K28-Sensitivität wurde in Agardiffusionstests an *S. cerevisiae* Stämmen nach Expression einer C-terminal GFP-markierten Erd2p-Variante mit dem Transportsignal aus dem C-Terminus von *IST2* bzw. nach Expression einer Erd2p-Variante mit zusätzlichem ER-Retentionssignal des „KKXX“-Typs bestimmt. Zum Vergleich ist der Sensitivitätstest an YA ERD2 (Expression einer wildtypischen *ERD2*-Kopie) und an YA12 ( $\Delta$ *erd2*) gezeigt. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [ $\emptyset$ ] der in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar eingebetteten Stämme wurde nach 5 Tagen bestimmt und dient als Maß für die K28-Sensitivität.

**Tabelle 15: K28-Sensitivitätstests an *S. cerevisiae* nach Expression von *ERD2*-Derivaten.**

Aufgelistet sind die im K28-Sensitivitätstest bestimmten Hemmhofdurchmesser in *erd2*-Deletionsstämmen nach Expression von *ERD2*-Derivaten. Als Kontrolle wurde der *erd2*-Deletionsstamm YA12 mitgeführt, der keine funktionelle *ERD2*-Kopie besitzt und durch die Überexpression des  $\Delta$ *erd2*-Suppressors *SEC12* überlebt. Die Sensitivitätstests wurden in Methylenblauagar durchgeführt. Eingesetzt wurde wildtypisches zehnfach konzentriertes K28-Toxin. Der vermessene Hemmfleck entspricht dem Durchmesser der wachstumsfreien Zone nach Subtraktion des eingestanzten Lochs, in welches 100  $\mu$ l Toxin gegeben wurde.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	exprimierte Erd2p-Variante	Hemmhof $\emptyset$
YA ERD2 (wt)	wildtypische ERD2-Sequenz ohne Intron	8,5 mm
YA12 ( $\Delta$ <i>erd2</i> )	-	0 mm
YA ERD2-NPF	Deletion des N-terminalen NPF-Motivs	4,5 mm
YA ERD2K/R	Lysin/Arginin-Austausch im C-Terminus	0 mm
YA ERD2-T <sub>207</sub>	Deletion von Threonin 207	7,5 mm
YA ERD2T <sub>207</sub> A	Threonin 207-Austausch gegen Alanin	6 mm
YA ERD2T <sub>207</sub> L	Threonin 207-Austausch gegen Leucin	7 mm
YA ERD2EGFP	C-terminale GFP-Markierung	8,5 mm
YA ERD2EGFP IST2C	GFP-Markierung und C-terminales Signal von IST2	5 mm
YA ERD2+KTN	C-terminales ER-Retentionssignal KKXX	6 mm

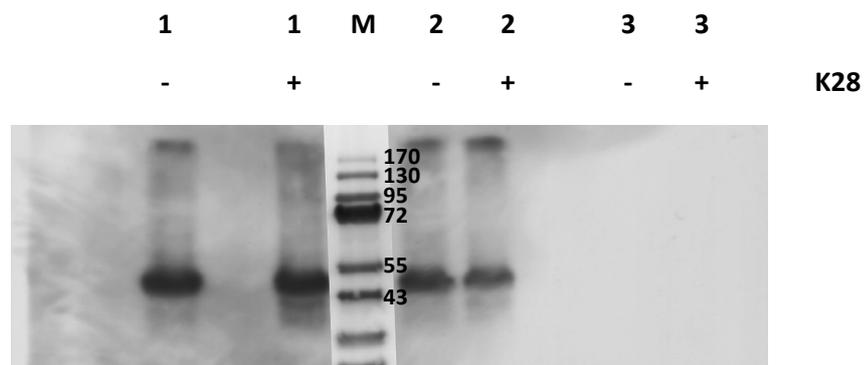
#### 4. Ubiquitinierung von Erd2p

Die durch Sensitivitätstests bestätigte Abhängigkeit der Erd2p/K28-Internalisierung von den C-terminalen Lysinresten des HDEL-Rezeptors weist auf eine Ubiquitinierung des Rezeptors hin. Bisher ist bekannt, dass Hefen mit Mutationen in *RSP5*, dem Gen der Ubiquitinligase, eine stark verminderte Sensitivität gegen K28 zeigen. Dieser Effekt scheint bei der ER-Zytosol-Dislokation des Toxins keine Rolle zu spielen (Heiligenstein, 2008). Eine Erklärung für den Sensitivitätsverlust könnte die Beteiligung von Rsp5p an einer Ubiquitinierungsreaktion im Rahmen der Internalisierung des Rezeptor/Toxin-Komplexes liefern.

##### 4.1 Untersuchungen zur *in vivo* Ubiquitinierung von Erd2p

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob in Western-Analysen ubiquitinierte Varianten von Erd2p im Zelllysate toxinbehandelter Hefen nachweisbar sind. Sollte Erd2p bei der Internalisierung von Erd2p/K28-Komplexen durch die Funktion der Ubiquitinligase Rsp5p monoubiquitiniert werden, könnten Erd2p-Kopien mit einem um 8,5 kDa vergrößerten Molekulargewicht nachgewiesen werden. Bei einer Oligo-, Poly- oder Multiubiquitinierung wären entsprechend höhere Molekulargewichte zu erwarten. Der Nachweis von wildtypischem Erd2p im Western-Blot kann nur über anti-Erd2p-Antikörper erfolgen. In Vorversuchen wurde jedoch ermittelt, dass der kommerziell erhältliche anti-Erd2p-Antikörper nicht die notwendige Sensitivität aufweist, um geringe Konzentrationen des Proteins nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollte die bereits als funktionell verifizierte Erd2pEGFP-Fusion über anti-GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde die *ERD2GFP*-Variante *ERD2K/RyEGFP* exprimiert. Dieser Variante fehlen die für die K28-Sensitivität notwendigen Lysinreste im C-Terminus, so dass vermutlich keine Ubiquitinierung der Rezeptorvariante stattfinden kann. Die Expression der *ERD2GFP*-Varianten wurde 24 Stunden in Galaktose-haltigem Medium induziert. Anschließend wurden je  $5 \times 10^8$  Zellen zwei Stunden bei 20°C parallel in Toxinkonzentrat und in einem entsprechenden Phosphat-Citrat Puffer (pH 4,7 nach McIlvaine,

1921) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der *S. cerevisiae* Stamm BY4742 ohne Expression einer *ERD2GFP*-Variante mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Gardner (vgl. Material und Methoden, Punkt 14). Das Ganzzelllysate wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und der Nachweis der Fusionsproteine durch Western-Analyse erbracht (vgl. Abbildung 42).



**Abbildung 42: Western-Analyse zum Nachweis von Erd2EGFP-Derivaten in *S. cerevisiae* nach K28-Toxinbehandlung.**

Die Abbildung zeigt die Western-Analyse der Zelllysate von BY4742 nach Expression von *ERD2GFP*-Fusionen.  $5 \times 10^8$  Zellen von *S. cerevisiae* BY4742 nach Expression von *ERD2yEGFP* bzw. der C-terminal lysinfreien Variante *ERD2K/RyEGFP* wurden 2 h bei 20°C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Der Wildtypstamm ohne Expression eines Fusionsgens wurde mitgeführt. Die Zelllysate wurden durch Glasperlenzellaufschluss nach Gardner (1998) erhalten. Nach Auftrennung im 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte über anti-GFP-Antikörper und einem sekundären HRP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, der über eine Chemolumineszenzreaktion die Detektion auf Fotofilmen ermöglichte. Benachbarte Spuren zeigen jeweils das Lysat aus unbehandelten Zellen sowie nach Toxinbehandlung.

- M:** Protein-Größenstandard „page ruler prestained“ (Fermentas)
- 1:** Ganzzelllysate aus BY4742 [pJD.6 *ERD2yEGFP*]
- 2:** Ganzzelllysate aus BY4742 [pJD.6 *ERD2K/RyEGFP*]
- 3:** Ganzzelllysate aus BY4742 (Negativkontrolle)
- : ohne K28-Toxinbehandlung
- + : nach K28-Toxinbehandlung

Im Ganzzelllysate nach Expression von Erd2EGFP ist das unmodifizierte Fusionsprotein entsprechend seiner theoretischen Größe von 53 kDa nachweisbar. Ein Signal auf gleicher Höhe ist auch in den Ansätzen nach Expression der C-terminal lysinfreien Erd2EGFP-Variante erkennbar. Ein

höhermolekulares Signal, das um das Molekulargewicht von Ubiquitin von 8,5 kDa (bei Monoubiquitinierung) oder ein Vielfaches (bei Poly- oder Multiubiquitinierung) vergrößert ist, war in keinem Ansatz erkennbar. Es war somit nicht möglich, eine Ubiquitinierung von Erd2p mit Hilfe von Western-Analysen zu bestätigen.

#### **4.2 Nachweis der Interaktion von Erd2p und Rsp5p mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation**

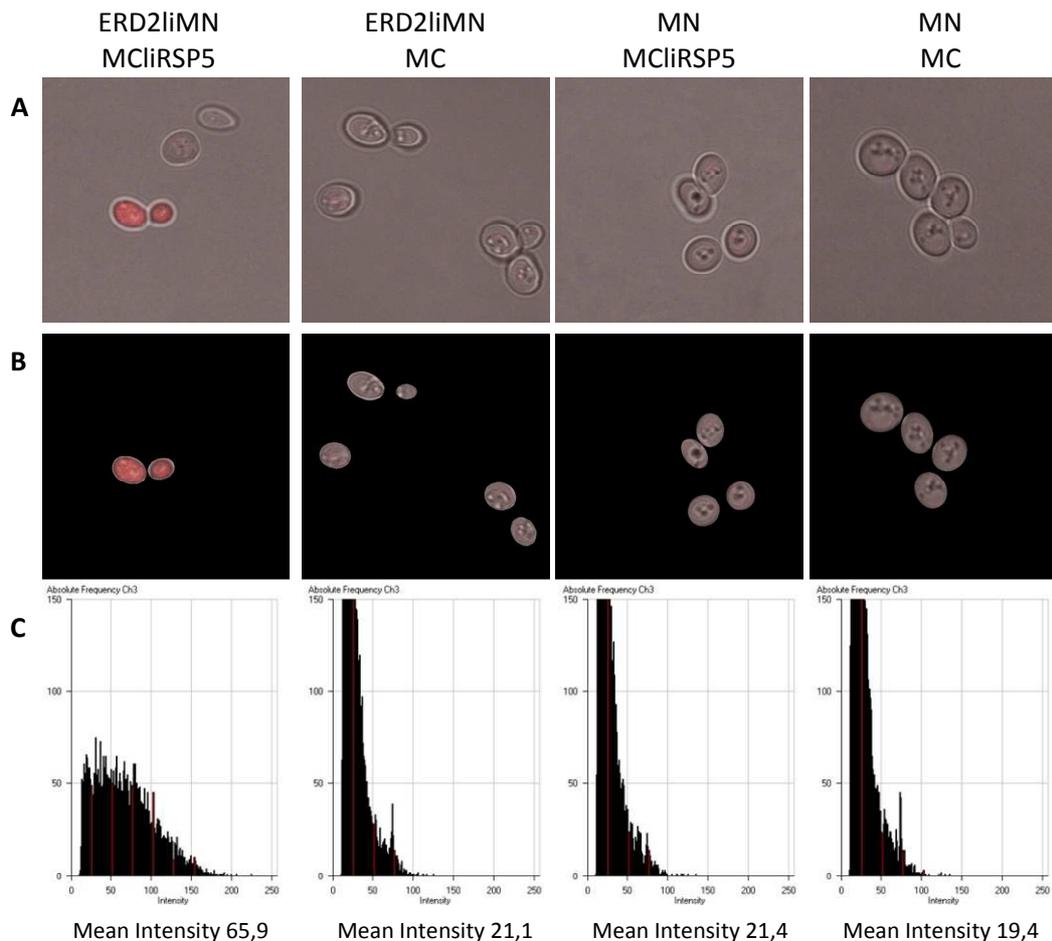
Um *in vivo* eine Bindung von Rsp5p an Erd2p bei der Internalisierung von K28 nachzuweisen, wurde die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) eingesetzt. Wie von Fan *et al.* (2008) beschrieben wurden dabei Fusionskonstrukte aus den beiden zu testenden Interaktionspartnern mit einem Teilbereich des rot fluoreszierenden Proteins mCherry erstellt. Der N-terminale Sequenzbereich (MN) enthält die ersten 159 Aminosäuren, der C-terminale Bereich (MC) die Aminosäuren 160 bis 236.

Analog zu den von Schäuble und Schorr etablierten Vektoren zur Expression von Fänger- und Beute-Fusionen zum Nachweis der Interaktion verschiedener zellulärer Proteine mit K28-Varianten, wurden in dieser Arbeit die Plasmide pRS316ERD2liMN, pRS315McliRSP5 und pRS315McliUBC4 verwendet (vgl. Diplomarbeiten Schäuble, 2008 und Schorr, 2009). Die wildtypische ERD2-Sequenz ohne Intron wurde über *XhoI* und *XbaI* in den Expressionsvektor pRS316liMN einkloniert. Die Strukturgene von *RSP5* und *UBC4* wurden über *Sall* und *XbaI* bzw. *Sall* und *PvuII* in pRS315Mcli einkloniert. Die Expression steht in diesen Vektoren unter der Kontrolle des Promotors  $P_{Gal1}$  und des *CYC1*-Terminators. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4742 wurde mit dem Fängerplasmid pRS316ERD2liMN mit einem der beiden Beuteplasmide pRS315McliRSP5 bzw. pRS315McliUBC4 kotransformiert. Um auszuschließen, dass eine Fluoreszenzkomplementation einzig durch eine Affinität der beiden mCherry-Teilsequenzen zu Stande kommt oder eine Interaktion zwischen einer der Teilsequenzen mit einem der beiden Fusionsproteine auftritt, wurden entsprechenden Koexpressionen durchgeführt. Als Kontrolle dienten die Koexpression mit pRS315MC bzw. pRS316MN, welche die alleinige

Expression der mCherry-Teilsequenzen ermöglichen (Schorr, unveröffentlicht). Die „linker“-Sequenz zwischen den beiden Proteinen sollten nach Kerppola (2006) die Faltung des Fusionsproteins erleichtern und somit verhindern, dass die natürliche Funktion des Beute- oder Fängerproteins eingeschränkt ist oder die Zugänglichkeit des mCherry-Teilbereichs zu seinem Partner beeinflusst ist.

Nach Koexpression der *ERD2*- und der *RSP5*-Fusionen wurde über konfokale Fluoreszenzmikroskopie die Rekonstitution des mCherry-Fluorophors zum Nachweis einer Interaktion beider Proteine überprüft. Hierzu wurden die Zellen nach 24stündiger Induktion in Galaktose-haltigem Medium geerntet und wie in Material und Methoden Punkt 16.2 beschrieben zur Mikroskopie vorbereitet. Die Aufnahmen zeigen eine schwache Fluoreszenz, welche bei den Kontrollen mit Koexpression des Beute- oder Fängerplasmids mit der jeweils anderen mCherry-Teilsequenz sowie der Koexpression der solitären mCherry-Teile nicht auftritt (vgl. Abbildung 43). Diese wenn auch schwache Fluoreszenz weist darauf hin, dass ein Teil der zellulären Kopien des markierten Rezeptors Erd2p mit der Ubiquitinligase Rsp5p interagiert.

Um diese Interaktion möglicherweise partiell zu verstärken, wurde eine Inkubation der Kotransformanden mit K28-Toxin durchgeführt (vgl. Abbildung 44). Die postulierte Beteiligung der Ubiquitinligase an der Internalisierung des Rezeptor/Toxin-Komplexes sollte dazu führen, dass die Interaktion von Erd2p und Rsp5p nach Liganden-Bindung verstärkt wird.



**Abbildung 43: Nachweis der Interaktion von Erd2p mit Rsp5p mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation in *S. cerevisiae*.**

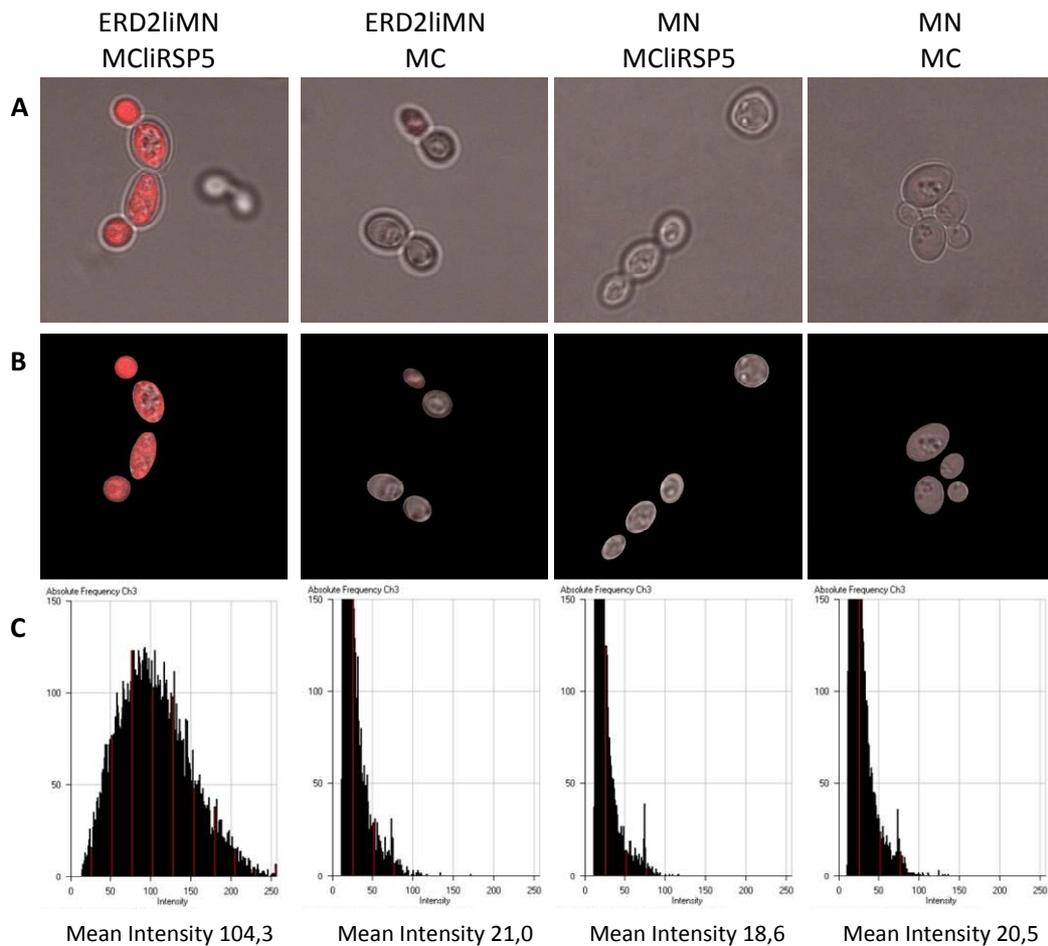
Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von *S. cerevisiae* BY4742 nach Koexpression von *ERD2liMN* und *MClIRSP5* bzw. nach Koexpression der Kontroll-Konstrukte (von links nach rechts: *ERD2liMN* und *MClIRSP5*; *ERD2liMN* und *MC*; *MClIRSP5* und *MN*; *MN* und *MC*). Anhand der unbearbeiteten Aufnahmen wurde die Intensität der Bildpunkte innerhalb der Zellgrenzen bestimmt.

**(A) mCherry-Fluoreszenz und Hellfeld.** Gezeigt ist die Überlagerung der roten mCherry-Fluoreszenzsignale mit dem Hellfeldbild. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; detector gain: 1010; average 4; scan speed 9; pinhole 240  $\mu\text{m}$ ; transmission 4,1 %

**(B) Bildbereichsauswahl über „Mask“.** Mit Hilfe der „Mask“-Funktion wurden die Bildbereiche außerhalb der Zellen ausgeblendet.

**(C) Fluoreszenzintensitäten über „Histo“.** Die Intensitäten der Bildpunkte in den ausgewählten Bildbereichen innerhalb der Zellen wurden über die Funktion „Histo“ in Form von Diagrammen angezeigt. Die Anzahl der Bildpunkte ist gegen ihre Intensität aufgetragen. Unter den Diagrammen ist das über die Funktion „Statistics“ ermittelte Intensitätsmittel aufgeführt.

Auswertung: Zeiss LSM Image Examiner v. 4.2.0.121



**Abbildung 44: Nachweis der verstärkten Interaktion von Erd2p mit Rsp5p nach Behandlung mit K28-Toxin mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation in *S. cerevisiae*.**

Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von *S. cerevisiae* BY4742 nach Koexpression von *ERD2liMN* und *MClirSP5* bzw. nach Koexpression der Kontroll-Konstrukte (von links nach rechts: *ERD2liMN* und *MClirSP5*; *ERD2liMN* und *MC*; *MClirSP5* und *MN*; *MN* und *MC*). Die Zellen wurden 2 h bei 20°C in K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Anhand der unbearbeiteten Aufnahmen wurde die Intensität der Bildpunkte innerhalb der Zellgrenzen bestimmt.

**(A) mCherry-Fluoreszenz und Hellfeld.** Gezeigt ist die Überlagerung der roten mCherry-Fluoreszenzsignale mit dem Hellfeldbild. Einstellungen: LSM 510 META; 100fache Vergrößerung; detector gain: 1010; average 4; scan speed 9; pinhole 240 µm; transmission 4,1 %

**(B) Bildbereichsauswahl über „Mask“.** Mit Hilfe der „Mask“-Funktion wurden die Bildbereiche außerhalb der Zellen ausgeblendet.

**(C) Fluoreszenzintensitäten über „Histo“.** Die Intensitäten der Bildpunkte in den ausgewählten Bildbereichen innerhalb der Zellen wurden über die Funktion „Histo“ in Form von Diagrammen angezeigt. Die Anzahl der Bildpunkte ist gegen ihre Intensität aufgetragen. Unter den Diagrammen ist das über die Funktion „Statistics“ ermittelte Intensitätsmittel aufgeführt.

Auswertung: Zeiss LSM Image Examiner v. 4.2.0.121

Die Intensität der vermessenen Fluoreszenz kann als Maß für die Stärke der Interaktion zweier Proteinfusionen im BiFC-System herangezogen werden. Mit Hilfe der Funktion „Histo“ der Software LSM Image Examiner (Zeiss, Jena) wurden anhand der unbearbeiteten Aufnahmen die Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Um die Zellgrenzen zu verdeutlichen, wurde mit „merge“-Bildern gearbeitet, bei denen die mCherry-Fluoreszenzsignale mit dem Hellfeldbild überlagert wurden. Zunächst wurden die Bildbereiche außerhalb der Zellen über die „Mask“-Funktion ausgeblendet. Über die Funktion „Histo“ wurde innerhalb des ausgewählten Zell-Bereichs die Häufigkeit der Bildpunkte gegen ihre Fluoreszenzintensität aufgetragen. In Abbildung 44 sind die resultierenden Diagramme sowie die durch die Funktion „Statistics“ ermittelten Intensitätsmittel für das Interaktionspaar und die Kontrollen gezeigt. Die Intensität der mCherry-Fluoreszenz nach einer zweistündigen Inkubation der Kotransformanden wurde mit der unbehandelten Zellen verglichen. Die vorliegenden Intensitätsmittel sind in Tabelle 16 aufgeführt und erlauben einen Vergleich der Fluoreszenzkomplementation bei der Koexpression der beiden Interaktionspartner Erd2p und Rsp5p mit den Kontrollexpressionen.

**Tabelle 16: Fluoreszenzintensität durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation bei Koexpression des Interaktionspaares Erd2p und Rsp5p in *S. cerevisiae*.**

Gezeigt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität nach Koexpression von *ERD2liMN* und *MClirSP5* sowie die Vergleichswerte der Kontrollen. Die Mittelwerte wurden anhand der Aufnahmen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software Zeiss LSM Image Examiner ermittelt. Die Bildbereiche innerhalb der Zellen wurden durch die Funktion „Mask“ ausgewählt und die Intensitäten der Bildpunkte mit der Funktion „Histo“ bestimmt. Die Mittelwerte der Fluoreszenz wurden durch die Funktion „Statistics“ berechnet.

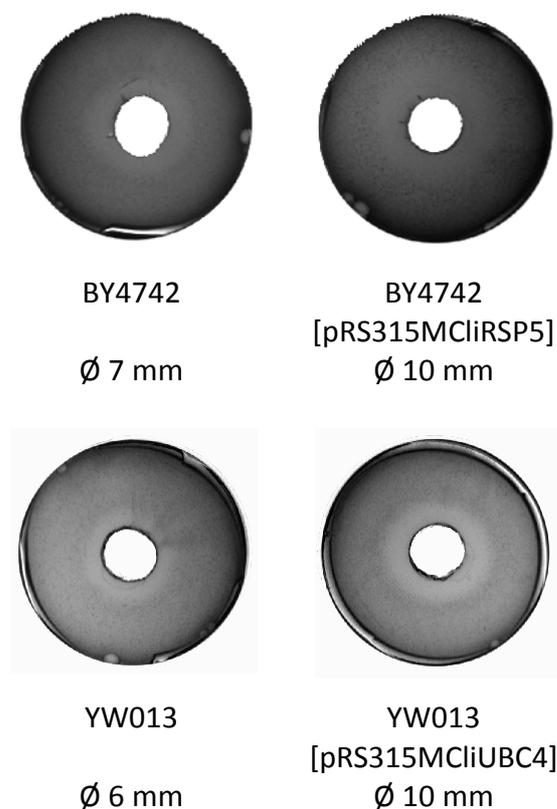
	Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensität im BiFC-System in <i>S. cerevisiae</i> nach Koexpression von			
	ERD2liMN MClirSP5	ERD2liMN MC	MClirSP5 MN	MN MC
Inkubation in McIlvaine-Puffer	65,9	21,1	21,4	19,4
Inkubation in K28-Toxinkonzentrat	104,3	21,0	18,6	20,5

Die Fluoreszenz beim Interaktionspaar ERD2MN/MCRSP5 liegt bei unbehandelten Zellen im Mittel bei einem Wert von 65,9 und zeigt damit eine auf das Dreifache erhöhte Intensität im Vergleich zu den Kontrollen. Durch die zweistündige K28-Toxinbehandlung konnte die Fluoreszenzintensität im Mittel auf einen Wert von 104,3 gesteigert werden. Damit liegt eine um den Faktor 5 erhöhte Intensität gegenüber den Kontrollen vor. Diese deutliche Fluoreszenzkomplementation bestätigt eine direkte Interaktion von Rsp5p und Erd2p.

Analog zur Identifizierung von Rsp5p als Interaktionspartner von Erd2p sollte auch eine mögliche Beteiligung von Ubc4p an der Internalisierung von K28 mit Hilfe des BiFC-Systems überprüft werden. Bei der Koexpression von *MCUBC4* mit *ERD2MN* konnten jedoch keine signifikanten Fluoreszenzsignale festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die *in vivo* Funktionalität der im BiFC eingesetzten Ubc4p- und Rsp5p-Fusionen wurde in K28-Sensitivitätstests bestätigt. Wie schon Heiligenstein in ihrer Dissertation zeigen konnte, weisen Mutanten mit reduzierter Rsp5p-Aktivität eine verminderte Sensitivität gegen K28 auf. Eine Überexpression der Ubiquitinligase kann den Phänotyp wieder herstellen (Heiligenstein, 2008). Die Funktionalität der im BiFC verwendeten Fusion *MClirSP5* sollte durch eine

Überexpression anhand einer Steigerung der K28-Sensitivität bestätigt werden. Abbildung 45 zeigt das Ergebnis der Agardiffusionstests an *S. cerevisiae* nach Expression der *RSP5*-Fusion. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, der einen Hemmhof von 7 mm zeigt, wurde nach Expression der *Rsp5*-Variante ein Hemmhof von 10 mm vermessen. Diese deutliche Steigerung der Sensitivität bestätigt die Funktionalität der mCherry-markierten Ubiquitin-Ligase-Variante.



**Abbildung 45: K28-Sensitivitätstest zum Nachweis der *in vivo* Funktionalität der Fusionen MClIUBC4 und MClIRSP5.**

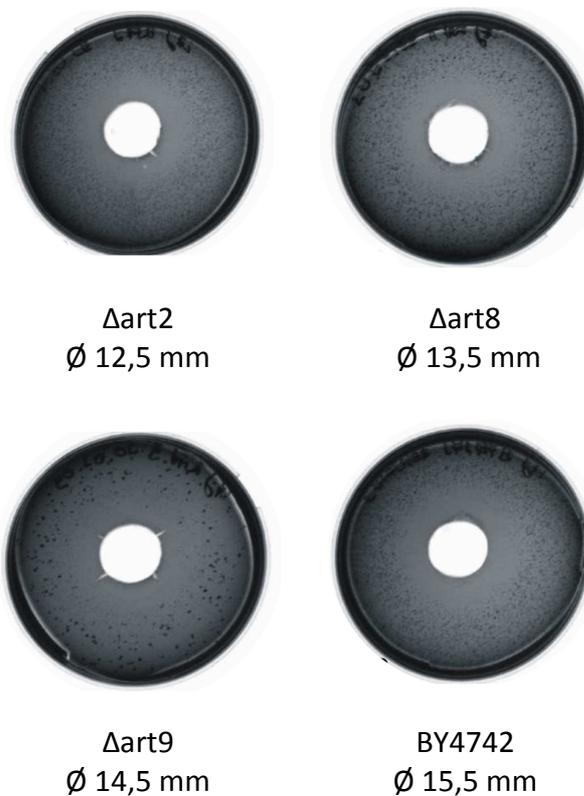
Die Abbildung zeigt die Agardiffusionstests der folgenden *S. cerevisiae* Stämme: BY4742 (Wildtyp); BY4742[pRS315MClIRSP5] (Expression des BiFC-Konstrukts MClIRSP5); YW013 ( $\Delta$ ubc4); YW013 [pRs315MClIUBC4] (Expression des BiFC-Konstrukts MClIUBC4). Es wurde ein K28-Toxin in 20facher Konzentration eingesetzt. Die Größe des Hemmhofdurchmessers [Ø] der in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar eingebetteten Stämme wurde nach 5 Tagen bestimmt und dient als Maß für die K28-Sensitivität.

Auch die Funktionalität der *UBC4*-Fusion wurde in Agardiffusionstests bestätigt (vgl. Abbildung 45). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die mangelnde Interaktion von Ubc4p und Erd2p im BiFC-System auf einen Funktionsverlust der eingesetzten Ubc4-Variante zurückzuführen ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine direkte Interaktion von Ubc4p (E2) mit dem HDEL-Rezeptor stattfindet, während eine Bindung von Rsp5p (E3) an Erd2p nachgewiesen werden konnte. Ferner konnte diese Interaktion durch extrazelluläre Toxin-Zugabe signifikant verstärkt werden. Dies bestätigt die Funktion von Rsp5p bei der Internalisierung des Rezeptor/Toxin-Komplexes in sensitiven Hefezellen.

#### **4.3 Nachweis der Beteiligung des Art-Adapter-Systems an der Toxizitätsvermittlung von K28**

Nachdem eine Interaktion von Erd2p und Rsp5p im Rahmen der K28-Endozytose gezeigt wurde, sollte die Frage adressiert werden, auf welche Weise die Erkennung des Rezeptors durch die E3-Ubiquitinligase erfolgt. Rsp5p stellt in *S. cerevisiae* das Homolog der HECT-Domänen-Ubiquitin-Ligase Nedd4 aus Säugerzellen dar. Rsp5p assoziiert mit Membranen und zeigt einen multi-Domänen-Aufbau. Die C-terminale HECT-Domäne ist für die E3-Aktivität verantwortlich. Klassischerweise erkennen die WW-Domänen von Rsp5p das Substrat an dessen PY-Motiv (Dunn und Hicke, 2001; Belgareh-Touze et al., 2008)). Ein solches Motiv ist allerdings in der Erd2p-Sequenz ebenso wie in den meisten Plasmamembranproteinen, die über eine Ubiquitinierung zur Endozytose markiert werden, nicht enthalten. Die Interaktion von Erd2p und Rsp5p könnte über sogenannte „arrestin related trafficking adaptors“, kurz Arts, vermittelt werden. In Hefe sind zahlreiche redundante Art-Proteine identifiziert, welche selbst PY-Motive enthalten und mit Rsp5p interagieren. Sie werden selbst ubiquitiniert und können über Bindung an Transmembranproteine der Plasmamembran auch deren Rsp5p-abhängige Ubiquitinierung ermöglichen (Lin et al., 2008; Mittal und McMahon, 2009; Nikko und Pelham, 2009).

Eine mögliche Beteiligung der Art-Proteine an der Erd2p-vermittelten K28-Internalisierung sollte sich an einer verminderten Sensitivität in *art*-Deletionsmutanten zeigen. In Agardiffusionstests wurden die *S. cerevisiae* Stämme  $\Delta art1$ ,  $\Delta art2$ ,  $\Delta art3$ ,  $\Delta art4$ ,  $\Delta art5$ ,  $\Delta art6$ ,  $\Delta art7$ ,  $\Delta art8$ , und  $\Delta art9$  auf ihre K28-Sensitivität untersucht. Die Deletionsmutanten für die Art-Proteine Art2p, Art8p und Art9p zeigen im MBA-Test eine leicht verminderte Sensitivität gegen K28 (vgl. Abbildung 46). Die übrigen Stämme zeigten keine veränderte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp BY4742.



**Abbildung 46: K28-Sensitivitätstest an ART-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae*.**

Die Abbildung zeigt die MBA-Sensitivitätstests gegen K28-Toxin in folgenden *S. cerevisiae* Deletionsmutanten:  $\Delta art2$ ,  $\Delta art8$  und  $\Delta art9$ . Als Kontrolle wurde der wildtypische Stamm BY4742 mitgeführt. Die Größe des Hemmhofdurchmessers [ $\varnothing$ ] der in Minimal-Galaktose-Methylenblau-Agar eingebetteten Stämme wurde nach 5 Tagen bestimmt und dient als Maß für die K28-Sensitivität. Es wurde ein K28-Toxin in 400facher Konzentration eingesetzt.

Der Effekt der Einzeldelationen von *ART2*, *ART8* und *ART9* wirkt sich durch eine Reduktion des Hemmhofs im Agardiffusionstest um 1 bis 3 mm gegenüber dem wildtypischen Stamm (15,5 mm) aus und ist damit zwar recht schwach, kann jedoch aufgrund der logarithmischen Abhängigkeit zwischen Toxindosis und Hemmhofdurchmesser als signifikant angesehen werden. Dennoch bestätigen diese Ergebnisse eine Beteiligung der Art-Proteine an der K28-Sensitivität in *S. cerevisiae*, was auf eine über Adapter-Funktion der Art-Proteine bei der Rsp5p-vermittelten Internalisierung des Erd2p/K28-Komplexes hinweist.

## IV Diskussion

Die hochkomplexen Abläufe in eukaryotischen Zellen beruhen auf einer strikten Trennung von Stoffwechselprozessen in abgeschlossenen Reaktionsräumen, den Organellen. Die umgebende Lipiddoppelschicht enthält Membranproteine, welche neben katalytischen und strukturgebenden Funktionen auch den Kontakt einzelner Organellen zueinander, zum Zytoplasma und im Fall der Plasmamembran zur Zellumgebung und zu Nachbarzellen vermitteln. Der Transport über Membranen erfolgt mit Hilfe von Carriern und Kanälen oder durch Abschnürung kleiner, membranumschlossener Einheiten, den Vesikeln, welche mit dem Zielorganell verschmelzen. Membranrezeptoren sind spezialisierte Membranproteine, die eine spezifische Bindung zu ihren Liganden eingehen. Die Rezeptor/Ligand-Komplexe werden über vesikulären Transport zwischen den Organellen befördert. Die Spezifität der Rezeptor/Ligand-Erkennung kann durch Sequenzmotive festgelegt werden.

Für den Rezeptor Erd2p der Hefe *S. cerevisiae* lautet das Erkennungsmotiv HDEL (Histidin – Aspartat – Glutamat – Leucin). Dieses Tetrapeptid findet sich am C-Terminus löslicher ER-residenter Proteine (Pelham *et al.*, 1988). In Säugern lautet das Signal KDEL (Munro und Pelham, 1987). Ein C-terminales Anfügen des Tetrapeptids bewirkt die Rückhaltung von Proteinen im ER von COS-Zellen ohne Beeinflussung ihrer Glykosylierungsmuster. Dies deutete auf einen Rückführungsmechanismus aus Golgi-Strukturen hin (Pelham, 1988). Durch ein Screening nach Mutanten, deren ER-Retention gestört ist, wurden in Hefe die Gene *ERD1* und *ERD2* identifiziert. Ein *ERD1*-Defekt resultiert in veränderten Glykosylierungsmustern (Hardwick *et al.*, 1990). Die exakte Funktion von Erd1p ist noch ungeklärt, Interaktionsstudien deuten aber auf eine direkte Bindung an Erd2p hin (Miller *et al.*, 2005). Bei Funktionsverlust von *ERD2* wird HDEL-Fracht sekretiert. Die Vermutung, dass es sich bei Erd2p um den HDEL-Rezeptor handelt, konnte durch die Kompensation des Retentionsdefekts bei Überexpression von *ERD2* bestätigt werden. Die

Membranlokalisation des 26 kDa großen Rezeptors wurde durch Hydrophathieblots und Fraktionierungsexperimente bestätigt. Eine Reduktion der Erd2p-Kopienzahl führt zu gravierenden Golgi-Defekten, eine vollständige Deletion des Rezeptors ist letal (Semenza *et al.*, 1990).

Das Retentionssystem wurde inzwischen in Vertretern aller eukaryotischer Reiche bestätigt. Die exakten Erkennungsmotive variieren zumeist in der viertletzten Position des C-Terminus. Aber auch stark abweichende Sequenzfolgen wie z.B. NDELK können die Rückführung zum ER vermitteln (Pfluger *et al.*, 2004; Vitale *et al.*, 1993). In Säugern scheint die Erkennung vorwiegend über das Peptidmotiv KDEL zu erfolgen. In der Spaltheife *Schizosaccaromyces pombe* lautet die Erkennungssequenz ADEL, in der Milchhefe *Kluyveromyces lactis* meist DDEL. Das humane Proteom verfügt über drei funktionell redundante Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität für KDEL- und HDEL-Signale (Munro und Pelham, 1987; Pidoux und Armstrong, 1992; Lewis *et al.*, 1990; Raykhel *et al.*, 2007). Während keine Komplementation zwischen einem humanen Rezeptor und Erd2p aus *S. cerevisiae* möglich ist, kann das Rezeptor-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* den letalen Phänotyp einer *erd2*-Hefemutante aufheben (Lewis und Pelham, 1990; Lee *et al.*, 1993).

Der kontinuierliche Rückführungsmechanismus beruht auf dem pH-Unterschied zwischen den beteiligten Kompartimenten. Während die Bindung des HDEL-Motivs im schwach sauren pH des Golgi-Apparats favorisiert wird, führt der neutrale pH-Wert im ER zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand. Der Rezeptor kann über den klassischen Sekretionsweg zum Golgi zurück geführt werden, so dass ein erneuter retrograder Transport ER-residenter Proteine ausgelöst werden kann (Mellman *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der hefeeigene HDEL-Rezeptor Erd2p bezüglich seiner Struktur und Funktion näher charakterisiert werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf seiner Bedeutung für die Endozytose des Proteintoxins K28 in der Hefe *S. cerevisiae*. Nach dem aktuellen Modell der K28-Endozytose stellt Erd2p nicht nur die Rezeptorfunktion zum retrograden Transport des Toxins, sondern nimmt auch die zentrale Position

bei der Clathrin-vermittelten Internalisierung über die Plasmamembran ein (Heiligenstein, 2008; Schmitt und Breinig, 2006). In dieser Arbeit sollte zunächst die postulierte Plasmamembran/ER-Kolokalisation des HDEL-Rezeptors in Hefe bestätigt werden. Im Zentrum des zweiten Projekts stand die Aufklärung der Membrantopologie von Erd2p, um anschließend anhand von Funktionalitäts- und Sensitivitätsstudien potentielle Endozytosemotive identifizieren zu können. Die von Heiligenstein gezeigte Beteiligung der Ubiquitinligase Rsp5p an der Toxizitätsvermittlung von Erd2p konnte bisher nicht in Verbindung mit einer Interaktion mit dem Toxin selbst gebracht werden (Heiligenstein, 2008; Heiligenstein *et al.*, 2006; Schorr, 2009). Eine mögliche Rsp5p-vermittelte Ubiquitinierung von Erd2p im Rahmen einer Ubiquitin-abhängigen rezeptorvermittelten Aufnahme des Toxins war Gegenstand weiterer Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.

#### **Die Lokalisation des HDEL-Rezeptors Erd2p in *S. cerevisiae***

Das aktuelle Modell der K28-Aufnahme geht von einem zweistufigen Mechanismus aus. Als Primärrezeptor wurde ein Mannoprotein der Zellwand identifiziert (Schmitt und Radler, 1987). Der Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran vermittelt die spezifische Endozytose des Toxins. Für einen rezeptorvermittelten Prozess spricht die rasche Aufnahme von K28, vergleichbar mit den Aufnahmekinetiken von Cholera- und Shiga-Toxin (Eisfeld, 2001; Majoul *et al.*, 1996; Sandvig *et al.*, 1994). Die Genprodukte von *END3* und *END4* sind am Internalisierungsprozess an der Plasmamembran der Hefe beteiligt. End3p wird im Komplex mit Sla1p und Pan1p für die Internalisierung und die kortikale Aktin-Zytoskelett-Reorganisation benötigt (Benedetti *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2000). End4p/Sla2p hat eine Funktion als Adapter zwischen Aktin und Clathrin bei der Endozytose (Baggett *et al.*, 2003). Die Deletion eines dieser Gene hat keinen Einfluss auf die Sensitivität von *S. cerevisiae* gegen ein ionophores Toxin wie K1, bewirkt jedoch eine vollständige Resistenz gegen K28 (Dissertation Eisfeld, 2001).

Eine Vielzahl an Daten spricht für den HDEL-Rezeptor Erd2p als Schlüssel zur endozytotischen Internalisierung von K28. Die Beteiligung des Rezeptors bei

der Sensitivitätsvermittlung in Zielzellen wurde erstmals durch eine K28-Resistenz von *erd2*-Deletionsmutanten beobachtet (Mentges, 1997). Nachdem eine Deletion des HDEL-Signals zu einem Toxizitätsverlust von K28 führte, wurde vermutet, dass der Rezeptor Erd2p das Retentionssignal des Toxins erkennt und dessen retrograden Transport innerhalb der sensitiven Zielzelle vermittelt (Eisfeld, 2001). Dass der Rezeptor zudem die zentrale Rolle bei der Internalisierung des Toxins über die Plasmamembran spielt, zeichnete sich anhand von Experimenten mit GFP-Toxin-Fusionen ab. In ihrer Dissertation konnte Spindler 2004 zeigen, dass das C-terminal angefügte HDEL-Motiv zur Aufnahme der K28-GFP-Derivate  $\alpha$ -GFP-HDEL,  $\alpha$ -GFP- $\beta$ -HDEL und GFP- $\beta$ -HDEL durch *S. cerevisiae* führt. Sogar die Toxin-freie Variante GFP-HDEL wurde internalisiert. Entsprechende Fusionen ohne HDEL-Signale waren nicht in der Lage, den Aufnahmemechanismus zu nutzen. Das Modell der Erd2p-vermittelten Internalisierung von K28 wird auch durch den Nachweis der Absättigung des Endozytosesystems bei Überangebot eines Liganden bestätigt. So waren GFP-HDEL-Fusionen in der Lage, in Konkurrenzexperimenten die Aufnahme von K28 signifikant zu reduzieren (Spindler, 2004).

Sollte Erd2p die Funktion des Plasmamembranrezeptors zur Internalisierung des Killertoxins K28 darstellen, müsste der Rezeptor zumindest in geringer Kopienzahl bis zur Zelloberfläche gelangen. Die bislang beschriebene intrazelluläre Verteilung der KDEL- und HDEL-Rezeptoren ist recht variabel und ergibt sich aus der Rezeptor-Funktion bei der Rückführung ER-residenter Proteine aus Golgi-Kompartimenten. Die derzeitige Vorstellung des Erd2p/Liganden-Recyclings zum ER geht von einem COPI-vermittelten („coat protein complex“) Vesikel-Transport aus. Der anterograde vesikuläre intra-Golgi-Transport ist als Alternativmodell zu dem Prinzip der Zisternenreifung stark umstritten (Pelham, 2001; Weiss und Nilsson, 2000). Gut belegt ist hingegen die Bedeutung von COPI-Vesikeln im retrograden Weg. In Hefe unterstützen experimentelle Daten ein Modell, nachdem der Golgi-ER-Transport über COPI vermittelt wird. Mutationen in COPI-Untereinheiten führten ebenso wie eine Deletion des KKXX-Motivs ER-residenter

---

Membranproteine dazu, dass diese Proteine bis zur Zelloberfläche gelangen. Auch eine direkte Interaktion von COPI-Untereinheiten mit KKXX-Peptiden konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Letourneur *et al.*, 1994; Cosson und Letourneur, 1994). An ERGIC-53 und anderen Transmembranproteinen der Säugerzelle, welche Golgi-Kompartimente retrograd durchlaufen, wurde der vesikuläre retrograde Transport bestätigt (Hauri *et al.*, 2000; Martinez-Menarguez *et al.*, 2001).

Übereinstimmend mit dem Golgi-ER-Recycling-Modell zeigt der bovine KDEL-Rezeptor in Säugerzellen eine Verteilung in kernnahen Golgi-Strukturen. Schwächere Signale wurden in punktuellen Strukturen des ER-Golgi-Intermediärkompartiments und ER-Substrukturen nachgewiesen (Tang *et al.*, 1993). Wird die intrazelluläre Konzentration an KDEL-Fracht erhöht, verschiebt sich die Verteilung zweier humaner KDEL-Rezeptoren von Golgi-Strukturen hin zum ER. Daraus kann gefolgert werden, dass sich die Rezeptor-Verteilung Liganden-abhängig anpasst, so dass ein Recycling unbeladener Rezeptoren zum ER minimiert wird (Lewis und Pelham, 1992a und b). Die Golgi-Lokalisation von PfErd2, dem KDEL-Rezeptor in *Plasmodium falciparum*, wurde über den gesamten Lebenszyklus des Parasiten bestätigt, eine Teilung der punktförmigen Strukturen tritt bei der Kernteilung auf (Elmendorf und Haldar, 1993). Über indirekte Immunfluoreszenz konnte der HDEL-Rezeptor in punktförmigen Strukturen lokalisiert werden, die weder dem Nukleus, noch vakuolären oder reinen ER-Strukturen entsprechen (Semenza *et al.*, 1990). Experimente von Miesenböck und Rothman (1995) deuten darauf hin, dass sich in der CHO-Zelllinie das ER-„retrieval“-System bis hin zum Trans-Golgi-Netzwerk erstreckt.

Eine Lokalisation des HDEL-Rezeptors an der Zelloberfläche würde voraussetzen, dass Erd2p nicht vollständig im ER zurückgehalten wird, so dass zumindest wenige Kopien über den Sekretionsweg jenseits des Golgi bis zur Plasmamembran gelangen. Eine solche Misslokalisierung ist bei ER-Proteinen mit KKXX oder KDEL-Signalen in Säugerzellen zwar hinreichend bekannt, in ihrer Funktion aber noch nicht detailliert untersucht. So ist beschrieben, dass Calnexin in unreifen Thymozyten auf der Zelloberfläche kolokalisiert und nicht

nur seine Funktion als Chaperon innerhalb des ER wahrnimmt. Als Funktion für Calnexin an der Plasmamembran wurde die Steuerung der Thymozyten-Reifung in einem CD3-Signal-Komplex vorgeschlagen (Wiest *et al.*, 1995). Auch lösliche ER-residente Proteine mit C-terminalen KDEL-Signalen wie die Chaperone BiP und GRP94 wurden in Form von Komplexen mit anderen Membranproteinen auf der Oberfläche von Thymocyten nachgewiesen (Wiest *et al.*, 1997). In einer Hybridoma-Zelllinie wurden die Proteindisulfidisomerase und Calretikulin auf der Plasmamembran detektiert, während andere KDEL-Proteine vollständig im ER zurückgehalten wurden. Vermutet wird ein Mechanismus, über den bestimmte KDEL-Proteine mit anderen zellulären Proteinen interagieren, so dass bei einer Komplex-Bildung ihre Retentionssignale blockiert sind und sie dem Rückhalte-System entgehen (Xiao *et al.*, 1999). Interessanterweise unterscheiden sich Tumorzellen von gesunden Zellen häufig durch die Zelloberflächen-Expression ER-residenter Hitzeschock-Proteine. Basierend auf diesem Unterschied in den Zelloberflächenmarkern wurde bereits ein Ansatz zur Immuntherapie vorgeschlagen (Multhoff *et al.*, 1995; Altmeyer *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 2003). Am Beispiel des Mannosephosphat-Rezeptors (MPR) wird ersichtlich, dass eine Rezeptor-Funktion in einem zentralen, intrazellulären Mechanismus weitere Aufgaben an der Zelloberfläche nicht ausschließt. Die klassische Funktion der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren besteht darin, saure Hydrolasen, welche an ihren Mannose-6-Phosphat-Gruppen erkannt werden, vom Golgi zu endosomalen und lysosomalen Strukturen zu transportieren. Der Rezeptor gelangt über den Sekretionsweg bis zur Zelloberfläche und fungiert dort als Rezeptor für andere Proteine, welche nicht zur Klasse der Hydrolasen gehören. Zu diesen Proteinen gehören u.a. die phosphomannosylierten Faktoren IGF II („insulin-like growth factor II“), TGF  $\beta$  („transforming growth factor  $\beta$ ), Proliferin, LIF („leukemia inhibitory factor“) und CD26 („cluster of differentiation“ 26). Die Erkennung und Internalisierung kann auch unabhängig von Mannose-6-Phosphat-Modifikationen erfolgen; dies ist der Fall bei der Internalisierung von Plasminogen, Retinsäure und Heparanase. Auf diese Weise spielen MPRs eine entscheidende Rolle auf der Zelloberfläche bei

der Regulation zahlreicher Signalwege und Differenzierungsprozesse (Kim *et al.*, 2009; MacDonald *et al.*, 1988; Purchio *et al.*, 1988; Lee und Nathans, 1988; Blanchard *et al.*, 1998; Ikushima *et al.*, 2000; Godar *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1998; Wood und Hulett, 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, dass Erd2p analog zu anderen Rezeptoren intrazelluläre Prozesse mit zusätzlichen Funktionen an der Zelloberfläche verbindet und über einen unvollständigen Retentionsmechanismus in einer relevanten Kopienzahl bis zur Plasmamembran gelangt. Über Immunfluoreszenz erhielt Heiligenstein in ihrer Dissertation erste Hinweise darauf, dass eine Subpopulation des Rezeptors Erd2p in Zellgrenzbereichen fixierter Hefezellen vorkommt. In fixierten Zellen einer *Δend3*-Mutante mit blockierter Endozytose wurde eine C-terminal mit einem Myc-tag markierte Rezeptorvariante über Antikörper in einer Ringstruktur nachgewiesen, welche mit dem Verteilungsmuster der Plasmamembran-ATPase Pma1p vergleichbar war (Heiligenstein, 2008).

Um die Verteilung des Rezeptors in *S. cerevisiae* möglichst nah am natürlichen Zustand untersuchen zu können, sollten Rezeptor-GFP-Fusionen verwendet werden. Bei diesem Versuchsansatz kann auf eine Fixierung verzichtet und die Verteilung in lebenden Hefezellen untersucht werden. Eine Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors ist hierbei grundsätzlich einer Überexpression vorzuziehen, da die Verteilung zellulärer Proteine bei einer stark erhöhten Kopienzahl zu veränderten Transportprozessen führen kann (Huh *et al.*, 2003). Der *S. cerevisiae* Stamm YBL040cGFPclone erlaubt die Expression von *ERD2GFP* unter Kontrolle des *ERD2*-eigenen Promotors und stammt aus der kommerziell erhältlichen „yeast GFP collection“ (Invitrogen, Darmstadt). Die Sammlung wurde im Rahmen einer großangelegten Studie zur Lokalisation des Hefe-Proteoms erstellt und deckt drei Viertel aller identifizierten Gene ab. Hierbei wurde für jeden in der Datenbank SGD („saccharomyces genome database“; [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org); Stanford University) annotierten ORF über PCR eine Genfusion für das C-terminal GFP-markierte Derivat hergestellt. Die Genfusion wurde zusammen mit einem Selektionsmarker über homologe Rekombination spezifisch an die endogene

---

Position der chromosomalen DNA eines haploiden Wildtyp-Stamms integriert. Auf diese Weise ist für essentielle Proteine die Funktionalität der Fusion bestätigt und die Expression erfolgt unter der Kontrolle des eigenen Promotors (Huh *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit durchgeführte konfokale Fluoreszenzmikroskopie an *S. cerevisiae* YBL040cGFPclone zeigte die bereits beschriebene Verteilung in intrazellulären, punktförmigen Substrukturen des Golgi, sowie eine ringförmige Fluoreszenz im Bereich des perinukleären ER. Einige der schwach fluoreszierenden Foci konnten dem Zellgrenzbereich zugeordnet werden. Dennoch erwies sich die detektierte Fluoreszenz als so schwach, dass keine Kollokalisationsstudien durchgeführt werden konnten.

Die Fluoreszenzintensität der zellulären Substrukturen konnte durch Expression verschiedener *ERD2EGFP*-Varianten unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors signifikant verstärkt werden. Die Verteilung stimmte dabei mit den Fluoreszenzmustern in YBL040cGFPclone überein. Im Zusammenhang mit der durchgeführten Funktionalitätsanalyse in einer  $\Delta$ *erd2*-Mutante und der Bestätigung einer identischen K28-Sensitivität nach Expression von Erd2EGFP und wildtypischem Erd2p kann gefolgert werden, dass die Fluoreszenzmarkierung keinen Einfluss auf die Funktion und Lokalisation des Rezeptors hat. Ein Einfluss des leicht zur Bildung von Dimeren tendierenden EGFP konnte durch vergleichende Lokalisationsstudien an einem Erd2-Fusionsprotein mit rein monomerischem EGFP ausgeschlossen werden. Die von Schuldiner und Mitarbeitern (2005) beobachtete, variierende Erd2p-Verteilung zwischen ER und Golgi in Abhängigkeit von dem gewählten Kulturmedium bestätigte sich in dieser Arbeit nicht. Unabhängig von Minimal- oder Komplexmedium konnte Erd2EGFP stets sowohl in ER- als auch in Golgi-Strukturen nachgewiesen werden. Diese Verteilung zwischen zwei Kompartimenten entspricht der von Tang *et al.* (1993) beschriebenen Lokalisation des bovinen KDEL-Rezeptors in Säugerzellen. mErd2 kann in kernnahen Golgi-Strukturen und in geringerem Ausmaß auch in punktuellen Strukturen des Golgi-ER-Intermediärkompartiments und ER-Subdomänen nachgewiesen werden (Tang *et al.*, 1993). Von Lewis und Pelham wurde

bereits 1992 beschrieben, dass sich nach Überexpression von KDEL-Fracht die Verteilung des KDEL-Rezeptors zum ER hin verschiebt. Die Verteilung der KDEL- und HDEL-Rezeptoren erweist sich also nicht als statisch, sondern passt sich an das Angebot an Liganden an, um eine optimale Rückführung bei gleichzeitig minimiertem unbeladenem Transport zu gewährleisten. Die Variabilität der Rezeptor-Lokalisation und die Tatsache, dass Erd2p kein klassisches ER-Retentionssignal des Typs KKXX zur eigenen Rückführung zum ER besitzt, legt nahe, dass ein Teil der Kopien sich auf dem Sekretionsweg jenseits des Golgi bewegen kann. Die in dieser Arbeit beobachteten Fluoreszenzfoci von Erd2EGFP im äußeren Zellgrenzbereich stützen diese These.

Die gewählte Expressionsstrategie mit Hilfe des *GAL1*-Promotors lieferte im Gegensatz zur Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors Signalintensitäten, welche die Durchführung von Kollokalisationsstudien mit Markerproteinen ermöglichten. Wie bereits in ersten experimentellen Ansätzen von Sevrieva gezeigt, kolloalisieren einzelne Fluoreszenzfoci mit der ringförmigen Fluoreszenz des mCherry-markierten Plasmamembranmarkers Can1p und den Eisosomenmarkern Pil1p und Sur7p (Sevrieva, 2009). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch die Kollokalisation mit dem Plasmamembranmarker Pma1p gezeigt. Bei Pma1p handelt es sich um die Plasmamembran-ATPase der Hefe, welche Protonen aus der Zelle ausschleust und somit den Hauptregulator des intrazellulären pH-Werts und des Membranpotentials der Plasmamembran darstellt. Sie besitzt zehn Transmembran-Einheiten und eine  $N_{in}$ - $C_{in}$ -Topologie (Serrano, 1978; Scarborough, 2000). Pma1p oligomerisiert innerhalb der Plasmamembran in „lipid raft“-Strukturen. Dieses Kompartiment innerhalb der Plasmamembran wird als MCP („membrane compartment of Pma1p“) bezeichnet und ist lateral vollständig abgegrenzt gegen eine zweite Gruppe von Subdomänen, das MCC („membrane compartment of Can1p“). Definiert wird das MCC von der Arginin-Permease Can1p, einem  $N_{in}$ - $C_{in}$ -Transmembranprotein mit zwölf  $\alpha$ -Helices. Dieses Kompartiment zeigt eine Ergosterol-abhängige „patch“-Organisation aus ca. 50 Flecken eines Durchmessers von 300 nm pro Zelle

(Ahmad und Bussey, 1986; Malinska *et al.*, 2003). Weitere in MCCs beherrschte Transporter sind die Uracilpermease Fur4p und die Tryptophanpermease Tat2p. Nur durch ein Aufheben der „patch-Struktur“ der MCCs z.B. in einer  $\Delta pil1$ -Mutante, wird Can1p homogen in der Membran verteilt und endozytiert. Die MCCs stellen also stabile Organisationsbereiche innerhalb der Plasmamembran dar, innerhalb derer die Membranproteine vor Endozytose geschützt sind. Bei Pil1p („phosphorylation is inhibited by long chain bases“) handelt es sich um eine Komponente des Eisosomenkomplex, welcher direkt unterhalb der MCCs lokalisiert werden konnte. Es wird postuliert, dass Pil1p zusammen mit Lsp1p im Zellkortex unmittelbar unterhalb der MCCs die Endozytose verhindert (Grossmann *et al.*, 2008; Malinsky *et al.*, 2010). Bislang sind Pil1p und Lsp1p als Komponenten der Eisosomen, spezialisierter Proteinkomplexe unmittelbar unterhalb der Plasmamembran beschrieben. Ihnen wird eine Beteiligung an der Initiation der Endozytose zugeschrieben (Walther *et al.*, 2006). Dieser scheinbare Widerspruch könnte jedoch durch die Beteiligung eines kürzlich identifizierten Lipid-Sensor-Proteins aufgehoben werden. Demnach nimmt Nce102p über Transmembran-Bereiche die Lipidumgebung von Plasmamembran-Subdomänen wahr. In den dichteren, Sphingolipid- und Ergosterol-reichen MCCs inhibiert Nce102p Pkh-Kinasen unmittelbar unterhalb dieser Domänen in Eisosomen. Ohne Pkh-Kinaseaktivität ist die Eisosomen-Struktur verändert. Die Eisosomen-Proteine kolokalisieren mit den Proteinen des MCC, werden aber durch Nce102p in einer Organisationsform gehalten, welche eine Endozytose nicht zulässt. Ändert sich durch intrazelluläre Signale die Lipidzusammensetzung, verlässt Nce102p die MCCs, die Eisosomen werden phosphoryliert. Die typische Eisosomen-Struktur wird ausgebildet, welche mit der Initiation der Endozytose in Verbindung steht (Fröhlich *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2008). Die wichtigsten Komponenten der Eisosomen-Komplexe stellen Pil1p, Lsp1p („long chain bases stimulate phosphorylation“) und Sur7p dar. Lsp1p ist strukturell und funktionell mit Pil1p verwandt, während Sur7p als Transmembranprotein direkten Einfluss auf den Sphingolipid-Gehalt in Plasmamembran-Subdomänen nehmen kann (Zhang *et al.*, 2004; Young *et al.*,

2002). Sphingolipide reichern sich mit Ergosterol, dem Analogon zu Cholesterin der Säuger, in „lipid rafts“ sowie in den größeren SRDs („sterole rich domains“) innerhalb von Membranen an und spielen u.a. eine Rolle bei der Endozytose. Eine Verwandtschaft zwischen Eisosomen und SRDs konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die Plasmamembran-Substrukturen wie Eisosomen, „lipid rafts“, SRDs und DRMs („detergent resistant membranes“) lassen sich mikroskopisch nur schwer gegeneinander abgrenzen, sind aber funktionell nicht identisch und gewährleisten eine laterale Strukturierung der Plasmamembran (Alvarez *et al.*, 2007; Lichtenberg *et al.*, 2005; Edidin, 2003). Pil1p und Sur7p wurden in dieser Arbeit in Form von mCherry-Fusionen als Eisosomen-Marker eingesetzt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Kollokalisationsstudien erlauben einen Vergleich der Erd2EGFP-Fluoreszenz nach dem bereits beschriebenen Muster zur Fluoreszenz der mCherry-markierten Markerproteine. Sowohl Pma1p als auch Can1p zeigen als Plasmamembranmarker die typische Verteilung im Zellgrenzbereich. Im fokussierten Querschnitt durchbrechen einzelne Erd2EGFP-Foci die ringförmige Fluoreszenz der markierten Plasmamembran. Der Vergleich der Erd2GFP-Verteilung mit den Expressionsmustern einer mCherry-markierten Variante des Golgi-Markers Anp1p, einer Untereinheit des Mannosyltransferase-Komplexes (Jungmann *et al.*, 1999), zeigte eine unvollständige Kollokalisierung an. Die intrazellulären punktuellen Strukturen von Erd2EGFP sind nicht vollständig dem Golgi zuzuordnen, sondern dem ER- und ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment. Die Eisosomen-Markierung über mCherry-Fusionen von Pil1p und Sur7p erzielte ein Verteilungsmuster analog zur Plasmamembran-Markierung. Auch hier wird erkennbar, dass die peripheren Erd2p-Foci im Bereich der ringförmigen Eisosomen-Fluoreszenz liegen. Diese Daten bestätigen das Vorkommen einer Erd2p-Fraktion in Clustern innerhalb oder unmittelbar unterhalb der Plasmamembran zusätzlich zur bereits belegten Lokalisation in ER und Golgi.

Das Anfügen des C-Terminus von Ist2p, einem zusätzlichen Signal für den Transport zur Zelloberfläche, führte zu einer grundlegenden Umverteilung von Erd2EGFP. Über die exakte Lokalisation von Ist2p herrscht noch keine

vollkommene Klarheit. Durch „protease protection assays“ erzielte Ergebnisse belegen eine Zelloberflächen-Lokalisation von Ist2p in Hefezellen (Jüscke *et al.*, 2004). Spätere Studien an Säugerzellen sprechen jedoch dafür, dass Ist2p zwar über einen vom klassischen Sekretionsweg unabhängigen Transportmechanismus bis zur Zellperipherie gelangt, dort aber in kortikalen ER-Strukturen unmittelbar unterhalb der Plasmamembran verbleibt (Ercan *et al.*, 2009). Der Versuch, Ist2-Fusionsproteine in extrazellulären Loops über Antikörper-Färbung an der Zelloberfläche nachzuweisen, blieb erfolglos. Ercan und Mitarbeiter stellen darüber hinaus fest, dass es mit konfokaler Mikroskopie nicht möglich ist, die kortikalen ER-Strukturen und die Plasmamembran getrennt voneinander aufzulösen. Auch wenn bei konfokaler Mikroskopie der Fokus auf Ebene der Plasmamembran liegt, erzeugen darunter liegende Bereiche bis zu einer Tiefe von 500 nm einen Hintergrund, der schwächere Signale kleinerer Strukturen unterhalb und Komplexe innerhalb der Plasmamembran überdecken kann. Die TIRF-Mikroskopie („total internal reflection“) hingegen regt die Fluoreszenz in einem auf 100 nm begrenzten Bereich unterhalb der Plasmamembran an (Steyer und Almers, 2001). Mit dieser Methode konnte die Kollokalisierung von Membranproteinen mit Ist2C-Signal und einem Plasmamembran-Marker zwar bestätigt werden, dennoch konnten diese Aufnahmen eine Zuordnung von Ist2-Fusionen zur Plasmamembran weder ausschließen noch bestätigen (Ercan *et al.*, 2009).

In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass die intrazellulären Membransysteme der einzelnen Organellen über spezialisierte Substrukturen miteinander verbunden sind. Von Levine und Loewen (2006) beschreiben Kontaktstellen, welche auch das ER mit der Plasmamembran verbinden und die Membranen zweier Organellen auf einen Abstand von nur 10 nm zusammenführen. Diese Kontaktstellen sind zwischen Mitochondrien und ER, zwischen Mitochondrien und Plasmamembran und zwischen ER und Vakuole nachgewiesen worden (Csordas *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2000). Ein gut untersuchtes Beispiel für eine Zusammenarbeit von ER und Plasmamembran bietet die STIM-aktivierte („stromal interacting molecule“) Kanal-Öffnung nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Säugerzellen. Bei diesem Vorgang gelangen STIMs,

ER-Transmembranproteine, auf 10 bis 25 nm an die Zelloberfläche heran und wirken aktivierend auf Ionenkanäle innerhalb der Plasmamembran (Wu *et al.*, 2006). Für den Lipidtransfer zwischen ER und trans-Golgi werden ebenfalls inter-Organell-Kontaktstellen vorgeschlagen (Perry und Ridgway, 2006). Die Existenz solcher Kontaktstellen, an denen ER-Substrukturen und die Plasmamembran in unmittelbarer Nähe zueinander stehen, schließt einen zweifelsfreien Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation von Ist2p und auch von Erd2p über das konventionelle Methodenspektrum der Fluoreszenzmikroskopie aus. Dennoch konnte in dieser Arbeit erstmals die Kolo-kalisation von Erd2p mit Plasmamembran-Markern und Proteinen der Eisosomen im Zellgrenzbereich gezeigt werden. Für eine Kolo-kalisation von Erd2p mit Can1p in Subdomänen der Plasmamembran sprechen Interaktionsstudien von Miller und Mitarbeitern. In dieser großangelegten Studie zur Interaktion von integralen Membranproteinen in Hefe wurde eine direkte Interaktion von Erd2p mit den MCC-Markerproteinen Can1p und Tat2p nachgewiesen (Miller *et al.*, 2005). Es scheint also durchaus plausibel, dass eine Fraktion des zellulären Erd2p-Pools in diesen Substrukturen der Plasmamembran vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zweites System zum Nachweis der Plasmamembran-Lokalisation einer zellulären Erd2p-Fraktion zur Anwendung gebracht. Diese Nachweismethode basiert auf der Rekonstitution eines Signalwegs, welcher essentiell für das Wachstum ist. Die Schlüsselkomponente dieses Signalwegs stellt RAS („rat sarcoma“), ein Proto-Onkogen dar. RAS-Proteine gehören einer Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine an. Punktmutationen in RAS-Genen sind für einen Verlust der Regulationsmechanismen verantwortlich und führen zu konstitutiv aktiven RAS-Varianten, welche in 20 % aller Tumore auftreten (Downward, 2003). Die normale Funktion der RAS-Proteine setzt eine posttranslationale Modifikation voraus. An der C-terminalen CAAX-Box wird RAS durch die Farnesyltransferase erkannt, welche die Isoprenoid-Kette auf einen Cysteinrest überträgt. Für zwei der drei humanen RAS-Isoformen wurde auch eine Palmitoylierung beschrieben. Wird die Farnesylierung verhindert, gelangt RAS nicht zur

Plasmamembran und verbleibt im Zytosol, unfähig, nachgeschaltete Ziele des Signalwegs zu aktivieren. Dieser Angriffspunkt wurde bereits durch verschiedene Ansätze z.B. unter Zuhilfenahme von Farnesyltransferase-Inhibitoren oder kompetitiven Farnesylcystein-Mimetika zur Tumorthherapie vorgeschlagen (Cox und Der, 1997; Hancock *et al.*, 1989 und 1990; Rotblat *et al.*, 2008). Untransformiertes RAS wird durch zwei Klassen regulatorischer Proteine in seiner Aktivität gesteuert. Zur ersten Klasse gehören die GAPs („GTPase activating proteins“), welche die GTPase-Aktivität stimulieren und RAS in GDP-gebundener Form inaktivieren. Die zweite Klasse regulatorischer Proteine wird durch die GEFs („guanine nucleotide exchange factors“) gebildet (Boguski und McCormick, 1993). In der Hefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass der Austauschfaktor Cdc25p, welcher den GDP-GTP-Austausch an RAS vermittelt, über seine SH3-Domäne an das RAS-Zielprotein, die Adenylatzyklase Cyr1p bindet (Mintzer und Field, 1999). Zur Bindung von RAS an Cyr1p ist zudem das akzessorische Protein Srv2p notwendig. RAS stimuliert daraufhin die Adenylatzyklase-Aktivität des Komplexes, wodurch die intrazelluläre Konzentration an cAMP („cyclic AMP“) steigt. In Folge dessen werden durch die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA Zielproteine phosphoryliert, welche ihrerseits u.a. die Transkription beeinflussen, den Energie-Metabolismus regulieren und das Zellwachstum fördern (Fedor-Chaikin *et al.*, 1990; Broach, 1991).

Border, Katz und Aronheim etablierten 1998 basierend auf dem RAS/cAMP-Signalweg ein *in vivo* Testsystem für die Interaktion von Proteinen in *S. cerevisiae*. Das System nutzt den von Petitjean konstruierten Hefestamm *cdc25-2*, der einen Defekt des Austauschfaktors für RAS aufweist. Der Aminosäure-Austausch E1328K in Cdc25p hat eine temperaturabhängige, vollständige Inaktivierung zur Folge, wodurch RAS nicht in seine aktive Form regeneriert werden kann (Petitjean *et al.*, 1990). Die Expression einer konstitutiv aktiven RAS-Variante aus dem Säuger kann den auftretenden Wachstumsdefekt aufheben. Im RAS „recruitment“-System (RRS) wird die RAS-Onkogen-Variante Ras(61) $\Delta$ F, deren Farnesylierungssignal CAAX deletiert ist, als Bestandteil eines Fusionsproteins eingesetzt. Die Variante kann die

Plasmamembran nicht autonom erreichen, sondern ist auf ein angefügtes Protein angewiesen, das bis zur Oberfläche gelangt. Ein solches lösliches, an RAS gekoppeltes Beuteprotein kann über eine direkte Interaktion mit einem Fängerprotein, welches an der Plasmamembran vorliegt, den temperaturabhängigen Phänotyp kompensieren. Die Lokalisation des Fängers kann durch ein Myristylierungssignal gewährleistet werden oder durch ein endogenes Transportsignal zur Plasmamembran. Die Methode wurde an den bereits bekannten Interaktionspaaren p110/p85, c-Jun/c-Fos; hSos/Grb2 und Pak65 mit SH3-Domäne-Proteinen sowie Rac1-Mutanten validiert. Das Testsystem wurde anfangs verwendet, um die Genprodukte einer cDNA-Bank auf ihre Interaktion mit zytoplasmatischen Faktoren zu überprüfen. Die ersten durch das RRS identifizierten Interaktionen betreffen ein Mitglied der Leucin-„zipper“-Familie, JDP2, und das Enhancer-bindende Protein C/EBP $\gamma$  sowie die Kinase Pak2 und das G-Protein Cdc42Hs (Border *et al.*, 1998; Aronheim *et al.*, 1998). Maroun und Aronheim entwickelten 1999 eine Variante des Testsystems, das innerhalb von Säugerzellen als Nachweismethode genutzt wird. In Hefezellen hat sich inzwischen auch die modifizierte Methode des reversen RRS bewährt, indem als Beute ein Plasmamembranprotein eingesetzt wird und RAS an den zytoplasmatischen Fänger fusioniert wird. Das RRS und seine Varianten wurden bereits angewendet, um Interaktionspartner für Plasmamembran-Kanäle und zytoplasmatische Rezeptoren zu identifizieren und um Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen zu testen (Liu und Gelli, 2008; Ecker *et al.*, 2009; Gunde und Barberis, 2005).

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neuartige Modifikation des RRS, das sich nicht auf den Nachweis einer Interaktion zweier Proteine, sondern auf die Lokalisation eines Membranproteins konzentriert. Die Nachweismethode wurde genutzt, um die Plasmamembran-Lokalisation von Erd2p zu bestätigen. Die konstitutiv aktive Säuger-RAS-Variante RAS(61) $\Delta$ F wurde an den C-Terminus des HDEL-Rezeptors angefügt und die Proteinfusion auf ihre Fähigkeit untersucht, den temperatursensitiven Phänotyp einer *cdc25* Mutante zu kompensieren. Um zwischen ER-Strukturen und der Plasmamembran unterscheiden zu können, wurde als Kontrolle eine

Proteinfusion aus Sec63p, einem ER-Transmembranprotein, mitgeführt. Der C-Terminus von Sec63p liegt zytoplasmatisch vor, erlaubt daher die zytosolische Orientierung des Reporterproteins RAS (Feldheim *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass die Sec63RAS-Fusion nicht in der Lage ist, den Wachstumsdefekt von *cdc25-2* aufzuheben. Es konnte also bestätigt werden, dass aus der ER-Lokalisation heraus die Aktivierung der Adenylatzyklase nicht möglich ist. Die durch Wachstumstests bestätigte Wiederherstellung des RAS/cAMP-Signalwegs durch Expression der Erd2RAS-Fusion konnte somit die Plasmamembranlokalisierung einer Fraktion des zellulären Erd2p-Pools bestätigen. Diese Ergebnisse belegen, dass ein Teil der auch fluoreszenzmikroskopisch bereits in der Zellperipherie nachgewiesenen HDEL-Rezeptor-Kopien nicht nur in Oberflächen-nahen ER-Strukturen vorkommt, sondern zweifelsfrei auch die Plasmamembran erreicht.

Die Bedeutung der Erd2p-Kolokalisation an der Plasmamembran im Rahmen der K28-Aufnahme konnte in dieser Arbeit durch zwei Rezeptor-Varianten mit zusätzlichen Transportsignalen bestätigt werden. Eine Einflussnahme auf die zelluläre Verteilung durch das Anfügen des IST2C-Signals bzw. eines ER-Retentionssignals KKXX reduzierte die K28-Sensitivität. Stehen dem Toxin durch ein verändertes Erd2p-Verteilungsverhältnis zwischen ER und Plasmamembran oder einer Beeinflussung des Erd2p-Transports weniger Kopien des Rezeptors an der Plasmamembran zur Verfügung, kann demnach weniger Toxin internalisiert werden. Die Kolokalisation des Rezeptors in beiden Membransystemen ist für die Aufnahme des Toxins K28 essentiell.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der natürlichen Aufgabe des Rezeptors auf Ebene der Plasmamembran. Die Funktion einer solchen Kolokalisation könnte in der Rückführung von ER-residenten Proteinen liegen, die über den Sekretionsweg jenseits des Golgi bis zur Zelloberfläche gelangt sind. Für die Chaperone Bip und GRP94 ist eine Lokalisation auf der Säugerzelloberfläche beschrieben. Auch die Proteindisulfidisomerase und Calretikulin, die ebenfalls KDEL-Signale tragen, wurden bereits auf der Plasmamembran detektiert (Wiest *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999). Der Nachweis des BiP-Homologs Kar2p unmittelbar unterhalb der Zellwand wurde

in Hefe bisher noch nicht geführt und würde sich experimentell deutlich schwieriger gestalten als eine Oberflächenfärbung an Säugerzellen. So kann zur Zeit noch keine Aussage getroffen werden, ob auch in Hefe ER-residente Chaperone dem Retentionsmechanismus entgehen und bis zur Oberfläche gelangen. Die Anpassung der zellulären BiP/Kar2p-Konzentration an Stress wie Hitzeschock oder ein Übermaß fehlgefalteter sekretorischer Proteine wurde bereits hinreichend beschrieben. Zwei regulatorische Elemente im Bereich des *KAR2*-Promotors sind für die Verstärkung der *KAR2*-Expression als Reaktion auf zellulären Stress verantwortlich (Seppä und Makarow, 2005; Mori *et al.*, 1992; Kohno *et al.*, 1993). Unter extremen Bedingungen garantiert bei der einzelligen Hefe nur die durch eine erhöhte Kar2p-Kopienzahl gewährleistete „Reparatur“ fehlgefalteter Proteine das Überleben. Dennoch erscheint es plausibel, dass ER-residente Proteine wie Kar2p unter natürlichen Bedingungen durch den HDEL-Rezeptor auch aus Kompartimenten jenseits des Golgi rückgeführt werden können. Die Kolo-kalisation des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran kann auf diese Weise den Verlust an ER-residenten Chaperonen minimieren. Erste *in vivo* Experimente deuten in der Tat darauf hin, dass in *KAR2*-defizienten Zellen von außen zugeführtes Kar2p die Überlebensfähigkeit wiederherstellt (Gießelmann, persönliche Mitteilung). Ein Transportweg der zur Zelloberfläche fehllokalisierten ER-residenten Proteine mit HDEL-Signal über den Rezeptor Erd2p scheint demnach in der Hefe zu existieren und wird von dem HDEL-tragenden Proteintoxin K28 als Mechanismus zur Einschleusung in die Zielzelle parasitiert.

### **Die Topologie des HDEL-Rezeptors**

Zelluläre Membranen sind Barrieren zur Trennung unterschiedlicher zellulärer Reaktionsräume. Das Geschehen innerhalb eines Reaktionsraums wird von den vorhandenen löslichen Proteinen als auch von Membranproteinen bestimmt. In Abhängigkeit von der jeweiligen Funktion unterscheidet sich von Zelle zu Zelle bzw. von Organell zu Organell der Gehalt an Transmembranproteinen in Art und Menge. Sie machen typischerweise 50% der Biomembranen aus. Die auf elektrische Isolierung angepassten

Myelinmembranen von Neuronen weisen einen Proteinanteil von nur 18% auf, während die Membranen der Mitochondrien für ihre Beteiligung am Metabolismus und der Energieerzeugung zu 75% aus Proteinen bestehen (Tan *et al.*, 2008). Bedenkt man, dass ein Drittel der Gene eines Organismus für Membranproteine kodiert und dass diese ca. 60% der „drug targets“ ausmachen, wird die Bedeutung der Membranproteine offensichtlich (Wallin und von Heijne, 1998; Hopkins und Groom, 2002). Die Funktionen von Membranproteinen reichen von Transportprozessen über die Membran, der enzymatischen Katalyse, der Verankerung von Zellen mit dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix, bis hin zur Zell-Zell-Interaktion und der Signalübertragung. Strukturell lassen sich drei Klassen festlegen: periphere Membranproteine, welche keinen direkten Kontakt zum Inneren der Doppellipidschicht eingehen; Lipid-verankerte Proteine, welche kovalent an Lipide gebunden sind und Transmembranproteine, welche die Membran ein- oder mehrfach durchqueren. Die Form, in der ein Transmembranprotein in die Lipiddoppelschicht eingelagert ist, bestimmt, welche seiner Domänen für Interaktionspartner und modifizierende Enzyme zugänglich sind. Somit ist die Kenntnis der Topologie – der Anordnung zytoplasmatischer, extrazellulärer und luminaler Bereiche sowie der Transmembraneinheiten – essentiell, um seine Funktion nachvollziehen zu können (Tan *et al.*, 2008).

In den äußeren Membranen von Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten befinden sich Membranproteine mit „ $\beta$ -barrel“-Struktur, während in den übrigen zellulären Membranen Transmembranproteine einem Schema aus einer oder mehreren  $\alpha$ -Helices folgen (Schulz, 2000). Der Großteil aller Rezeptoren in Säugerzellen gehört topologisch wie funktionell einer der beiden großen Rezeptor-Klassen an. 67% der in einer Studie von Almen *et al.* (2009) erfassten Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit der typischen Topologie von sieben Transmembraneinheiten und einem zytoplasmischen C-Terminus. Die zweite große Gruppe stellen die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, welche dem Muster von Typ I-Transmembranproteinen mit einer TM-Einheit und einem zytoplasmischen C-Terminus entsprechen (Almen *et al.*, 2009). Die experimentell bestätigten Topologien der beiden Erd2p-

Homologe aus *Bos taurus* und *Arabidopsis thaliana* hingegen zeigen eine abweichende Topologie mit jeweils sechs Transmembransegmenten und zytosolisch orientierten Termini (Singh *et al.*, 1993; Brach *et al.*, 2008). Mit diesem Aufbau folgen sie der *in vivo* begünstigten Topologie mit einer N<sub>in</sub>-C<sub>in</sub>-Orientierung, wie sie von Krogh und Mitarbeitern bereits 2001 beschrieben wurde. In vergleichenden Topologie-Analysen am Membranproteom von *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster*, *A. thaliana* und zahlreicher gram-positiver wie gram-negativer Bakterien wurde bestätigt, dass eine gerade Anzahl an Transmembraneinheiten mit einer N<sub>in</sub>-C<sub>in</sub>-Topologie bevorzugt auftritt. Die einzige Ausnahme stellt *C. elegans* dar; der außergewöhnlich hohe Anteil an Rezeptoren des sieben-Transmembran-Typs mit nicht-zytoplasmatischem N-Terminus verschiebt das Gleichgewicht einseitig. Der evolutionär konservierte Membranprotein-Aufbau aus einer geraden Anzahl an Transmembraneinheiten kann als Abfolge aneinander gereihter helikaler „Hairpins“ aufgefasst werden, die Module aus zwei Transmembran-Helices darstellen, welche über einen nicht-zytoplasmatischen Loop verbunden sind (Krogh *et al.*, 2001). Diese Struktur wird vermutlich als „Insertionseinheit“ während des Membran-Protein-Einbaus über den Sec-Komplex integriert (Gafvelin *et al.*, 1997). Für die Aminosäuresequenz des N-Terminus gelten hohe Anforderungen, um eine Translokation über bakterielle und eukaryotische Membranen zu erlauben. Daraus lässt sich ebenfalls ableiten, dass sich eine N<sub>out</sub>-Konformation evolutionär ungünstiger erweist als eine zytosolische Orientierung des N-Terminus mit größeren Freiheitsgraden (Monne *et al.*, 1999).

Auch das in dieser Arbeit vorgestellte *in silico* Modell der Erd2p-Topologie folgt einer N<sub>in</sub>-C<sub>in</sub>-Konformation. Diesem Modell liegt eine Kombination aus Topologie-Vorhersagen und dem Vergleich mit den experimentell bestätigten Topologien zweier homologer Rezeptoren zugrunde. Die Topologie eines Membranproteins - eine Beschreibung seiner Struktur in sehr niedriger Auflösung - kann über experimentelle Methoden wie Genfusionen, proteolytischen Verdau, Antikörper-Bindung und chemische Modifikation bestimmt werden. In größerem Maßstab haben sich automatisierte

Vorhersage-Methoden über bioinformatische Algorithmen bewährt. Solche Algorithmen begründen sich auf den bisherigen Kenntnissen über die Aminosäure-Verteilung in Transmembrandomänen. Transmembransequenzen zeichnen sich durch eine hohe Hydrophobizität aus, welche als physikochemischer Parameter z.B. in Form des von Kyte und Doolittle aufgestellten Hydropathieindex in die Vorhersagealgorithmen eingeht (Kyte und Doolittle, 1982). Ein Amphiphilizitätsindex trägt der Stabilisierung der Helix innerhalb der Membran durch amphiphile Seitenketten an den Helix-Enden Rechnung (Hirokawa *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist die Länge der hydrophoben Segmente ausschlaggebend, ob eine membrandurchspannende Helix ausgebildet wird. Der hydrophobe Kern hat im Allgemeinen eine Länge von 15 bis 30 Aminosäuren (von Heijne, 1995). Eine weitere Charakteristik von Transmembran-Helices ist ihre Einlagerung in die Membran, so dass verbindende, nicht-membrandurchspannende Schleifenstrukturen („loops“) mit positiv geladenen Seitenketten zytosolisch vorliegen. Dieser Grundsatz geht als „positive inside rule“ in die Topologie-Vorhersage ein. Diese präferierte Orientierung wurde in Bakterien mit dem elektrochemischen Potential der inneren Membran begründet, welche gegen eine Translokation positiv geladener Reste arbeitet (Andersson und von Heijne, 1994). Eine Kombination mehrerer Vorhersage-Algorithmen kann die Zuverlässigkeit des *in silico* Ansatzes steigern (Xia *et al.*, 2003). Die Integration evolutionärer Information, also die Berücksichtigung homologer Sequenzen mit vermutlich homologer Topologie, führt ebenfalls zu einer höheren Genauigkeit der Vorhersagen (Viklund und Elofsson, 2004). Eine weitere Verbesserung der Vorhersage-Ergebnisse kann durch eine Beschränkung der Freiheiten vor Durchlaufen des Vorhersage-Prozesses erzielt werden. 11 % der eukaryotischen Membranproteine besitzen Domänen, für die eine Kompartiment-spezifische Lokalisation bekannt ist. Geht eine Suche nach solchen Domänen der Topologie-Vorhersage voraus und legt für einzelne Substrukturen die Orientierung bereits zuvor fest, können die Vorhersagen deutlich verbessert werden (Bernsel und von Heijne, 2005). Für alle Vorhersage-Programme wird eine Optimierung durch ein Training an

Datenbanken mit bekannter Topologie durchgeführt. Unerlässlich sind die Datenbanken mit experimentell bestätigten Topologien. Die Struktur eines Transmembranproteins aufzuklären gestaltet sich experimentell ungleich schwieriger als die Struktur-Analyse globulärer Proteine (von Heijne, 1999). Folglich gehören weniger als 1 % aller bekannten dreidimensionalen Proteinstrukturen den Transmembranproteinen an (Berman *et al.*, 2000). Die erste dreidimensionale Struktur eines Transmembranproteins wurde mit der licht-sensitiven Protonenpumpe Bakteriorhodopsin aufgeklärt und liegt inzwischen in einer nahezu atomaren Auflösung vor (Henderson und Unwin, 1975; Henderson *et al.*, 1990). Aktuell sind in Proteindatenbanken die hochaufgelösten Strukturen von 180 einzelnen Membranproteinen abrufbar. Diese Zahl steht mehr als 60.000 hoch auflösenden Strukturen von löslichen Proteinen gegenüber (White, 2008; Protein Data Bank, [www.pdb.org/pdb/home/home.do](http://www.pdb.org/pdb/home/home.do)). Eine vollkommen neue Strategie gingen kürzlich Cooper und Mitarbeiter ein. Sie ließen die menschliche Mustererkennung als zusätzliches Werkzeug in die Vorhersage von Proteinstrukturen einfließen. In „foldit“, einem „multiplayer online game“ versuchen Computer-Spieler, für eine ungefaltete Proteinkette die energetisch günstigste dreidimensionale Struktur zu finden. Diese Herangehensweise optimiert die Vorhersage-Methodik, welche bisher auf reine Rechenoperationen beschränkt war. Selbst kleine lösliche Proteine haben etwa 1000 Freiheitsgrade, was zu einer enormen Vielfalt an möglichen Strukturen führt. Die rein rechnerische Lösung solcher Problemstellungen ist beschränkt. Die menschliche visuelle Mustererkennung und erfahrungsbasierte Entscheidungsfindung können zusammen mit den stochastischen und deterministischen Fähigkeiten der „Rosetta structure prediction“-Algorithmen einen neuen, leistungsfähigeren Ansatz zur Struktur-Vorhersage liefern (Cooper *et al.*, 2010). Inwiefern ein solches Mensch-Computer-Netzwerk auch die Vorhersage-Programme für Transmembranproteine erweitern und verbessern kann, ist noch unklar.

Zur Festlegung des *in silico* Topologie-Modells für Erd2p aus *S. cerevisiae* wurde zunächst die Anzahl und die Orientierung der Transmembran-Helices

mit Hilfe der Vorhersageprogramme SOSUI, HMMTOP, TMHMM, DAS, DAS-Tmfilter, Tmpred, Phobius, MEMSAT und TopPred bestimmt (Hirokawa *et al.*, 1998; Tusnady und Simon, 1998; Krogh *et al.*, 2001; Cserzo *et al.*, 1997; Cserzo *et al.*, 2002; Hofmann und Stoffel, 1993; Käll *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1994; von Heijne, 1992). Die erhaltenen Vorhersagen differieren erwartungsgemäß stark. Während die dritte, fünfte, sechste und siebte hydrophobe Sequenzeinheit von Erd2p mit hoher Übereinstimmung erkannt wird, werden die ersten beiden hydrophoben Segmente sehr unterschiedlich beurteilt. Die Unterschiede in der Festlegung von Länge und Position sowie der Anzahl der Transmembraneinheiten zeigen die Schwächen der Vorhersagealgorithmen auf. Der deutliche Vorteil der „prediction server“ im Vergleich zur *in vivo* oder *in vitro* Analyse einer Membrantopologie liegt sicherlich darin, ohne nennenswerten finanziellen Aufwand innerhalb kürzester Zeit ein Modell der Membran-Insertion eines Transmembranproteins aufstellen zu können. Dennoch bleibt die Erkennung bestimmter Transmembransequenzen schwierig; die fehlerhafte Einordnung einer Signalsequenz als Transmembraneinheit kann drastische Unterschiede der berechneten zur tatsächlichen Topologie zur Folge haben. Ignoriert werden immer noch „re-entrant loops“, kurze Unterbrechungen des Strukturmotivs zwischen zwei aufeinander folgenden Helices sowie Helices, welche der Membran nur aufgelagert sind, sie aber nicht durchspannen (Käll *et al.*, 2004; von Heijne, 2006). Neuere Erkenntnisse bezüglich der topologischen Vielfalt zeigen große Schwierigkeiten bei der Vorhersage auf. Demnach muss die Topologie von Membranproteinen nicht statisch sein, sondern kann je nach Bedingungen variieren. Das an der Lyse von Bakterien beteiligte Holin des Phagen 21 besitzt zwei hydrophobe Einheiten. Beide werden zunächst in die zytoplasmatische Membran eingelagert, als Reaktion auf eine Änderung des Membranpotentials verlässt eine Transmembraneinheit die Membran ins Periplasma. Der Membranaustritt der N-terminalen Helix ist notwendig, damit die Dimerisierung zweier Holine erfolgen kann, welche wiederum die Bildung von Poren in der Membran auslöst (Park *et al.*, 2006). An monocistronisch kodierten Mitgliedern der SMR-Familie („small multidrug resistance transport

proteins“) wurde kürzlich gezeigt, dass durch dasselbe Gen kodierte Kopien eines polytopischen Membranproteins in gegenläufiger Orientierung vorliegen (Kolbusz *et al.*, 2010). Da bioinformatische Algorithmen einzig auf der Analyse der Primärsequenz eines Proteins beruhen und weder Protein-Protein-Interaktionen, Signalprozesse noch Änderungen der Umgebungsbedingungen in die Analyse mit einfließen lassen können, entziehen sich die letztgenannten topologischen Sonderfälle einer umfassenden Untersuchung durch Computer-basierte Methoden. Die Einschränkungen der Algorithmen-basierten Topologie-Analyse machen deutlich, dass die Bestätigung eines *in silico* erstellten Topologie-Modells anhand von *in vitro* bzw. *in vivo* durchgeführten experimentellen Studien unabdingbar ist.

Das aufgestellte Modell der Erd2p-Topologie wurde in drei experimentellen Ansätzen *in vivo* überprüft. Zu diesem Zweck wurden über PCR verkürzte *ERD2*-Varianten hergestellt, deren Genprodukte nach einer der sieben hydrophoben Einheiten des *in silico* Modells C-terminal verkürzt sind (vgl. Gießelmann, 2007). Mit pJD.1 wurde ein Vektorsystem konstruiert, welches die Expression der *ERD2*-Varianten als Fusionen mit einem der drei in dieser Arbeit eingesetzten, C-terminalen Reporter ermöglichte. Nachdem die Erd2p-Topologie mithilfe der *in vivo* Reporter SUC2A-HIS3 und HIS4C (vgl. Gießelmann, 2007; Kolb, 2008) nicht aufgeklärt werden konnte, wurden in der vorliegenden Arbeit drei voneinander unabhängige Reporter zum Einsatz gebracht.

Der Glykosylierungsreporter SUC2AV5 sollte einen Nachweis von verkürzten Erd2p-Reporter-Fragmenten erbringen, deren C-Terminus auf der luminalen Membranseite liegt. Eine N-Glykosylierung an dem klassischen Erkennungsmotiv NXT/S (Asparagin – jede Aminosäure außer Prolin – Threonin oder Serin) ist nur innerhalb des ER-Lumens, nicht aber auf der zytosolischen Membranseite möglich (Lehle *et al.*, 2006). Die durch diese posttranslationale Modifikation erreichte Größenzunahme kann über SDS-PAGE mit anschließender Western-Analyse nachgewiesen werden. SUC2A ist eine Kasette der Invertase Suc2p mit drei N-Glykosylierungsstellen. Erstmals

wurde Suc2p von Sengstag und Mitarbeitern (1989) erfolgreich zur Topologie-Analyse von zwei Isozymen in Hefe eingesetzt. In diesen Experimenten kam die vollständige Suc2p-Sequenz am C-Terminus zusammen mit einem Wachstumsreporter zum Einsatz. Gilstring und Ljungdahl (2000) untersuchten die Topologie von Gap1p („general amino acid permease“) mit deutlich kürzeren Sequenzen aus Suc2p2, den Kassetten SUC2A und SUC2B, welche zwischen die hydrophoben Einheiten des vollständigen Membranproteins inseriert werden können. Erd2p selbst besitzt keine eigenen N-Glykosylierungsmotive und ist daher optimal geeignet zur *in vivo* Topologie-Analyse über Glykosylierungsreporter. Der Nachweis aller sieben Erd2p-Reporter-Varianten gelang in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des V5-„tags“, das im Vergleich mit drei weiteren „tags“ (HA, FLAG, Myc) die höchste Sensitivität für die Detektion von Erd2p-Varianten gewährleistete. Es wurden zusätzlich Deglykosylierungen über einen Endoglykosidase-Verdau mit EndoH durchgeführt. Die *in vivo* Topologie-Analysen mit Hilfe von SUC2AV5 bestätigten die zytoplasmatische Orientierung der N- und C-Termini von Erd2p und konnten auch die luminale Orientierung des vierten hydrophoben Segments bestätigen. Die Schwäche des verwendeten Systems zeigte sich an der Reporterfusion mit Verkürzung nach dem dritten bzw. sechsten hydrophoben Segment. Erd2.3SUC2AV5 zeigte bereits ohne EndoH-Verdau in der Westernanalyse zwei Banden, welche einer unglykosylierten und einer glykosylierten Form entsprachen. Der C-Terminus dieser verkürzten Erd2p-Variante liegt demnach bei etwa der Hälfte der Kopien zytosolisch und der anderen Hälfte nicht-zytosolisch orientiert vor. Diese Verteilung kann durch eine unvollständige Integration der dritten hydrophoben Einheit erklärt werden. Die sechste hydrophobe Einheit wurde wider Erwarten in einer unglykosylierten Form nachgewiesen. Ohne die siebte hydrophobe Einheit erfolgt demnach keine Integration der vorangehenden Helix. Auch drei weitere leicht verändert verkürzte Erd2.6p-Varianten zeigten nicht das erwartete Insertionsmuster (Daten nicht gezeigt). Die Verkürzung von Transmembranproteinen mit mehreren Transmembraneinheiten kann zu sogenannten „frustrierten“ Topologien führen. Die C-terminale Fusion eines

Reporters an verkürzte Erd2p-Varianten kann dazu führen, dass die Aminosäureverteilung der verbindenden „loop“-Struktur verändert ist. Diese veränderte Aminosäureverteilung kann zu einem Effekt führen, welcher aus Insertionsstudien von polytopischen Membranproteinen mit veränderter Ladungsverteilung innerhalb von „loops“ bekannt ist. In solchen artifiziellen Systemen zeigte sich, dass Membranproteine, deren Ladungsverteilung entsprechend der „positive inside rule“ eine inkompatible Orientierung einer Transmembran-Helix zur Folge hätte, eine „leave one out“-Topologie annehmen. In diesem Fall werden nicht alle hydrophoben Einheiten als Transmembransegmente integriert (Gafvelin und von Heijne, 1994). Im Fall von Erd2p bestätigten die Ergebnisse des Glykosylierungsreporter-Assays die Orientierung der ersten, zweiten, vierten, fünften und siebten hydrophoben Einheit. Im Zusammenhang dieser Daten kann der dritten hydrophoben Einheit nur eine Transmembran-Orientierung in Richtung Lumen bzw. extrazellulär zugeordnet werden. Auch die sechste hydrophobe Einheit kann nur in entgegengesetzter Orientierung zu ihren beiden benachbarten Transmembranbereichen inseriert werden. Es lässt sich also folgern, dass das hier vorgestellte *in silico* Topologie-Modell durch den Reporter SUC2AV5 bestätigt wird.

Zur Topologie-Analyse des HDEL-Rezeptors wurde zudem die bereits erfolgreich zur Plasmamembran-Lokalisierung eingesetzte, modifizierte Methode des RRS verwendet. Es stand nicht zu erwarten, dass die schrittweise Verkürzung des C-Terminus von Erd2p im Rahmen der *in vivo* Topologie-Analyse zu einer veränderten Lokalisation führen würde. Die Plasmamembran-Lokalisation beruht einzig auf einem Einschleusen des Proteins in den Sekretionsweg unter der Voraussetzung, dass keine vollständige Retention im ER oder Golgi erfolgt. Erd2p verfügt nicht über ein klassisches Retentionssignal und die Ergebnisse der Lokalisationsstudien zeigen, dass eine Fraktion des zellulären Erd2p-Pools bis zur Plasmamembran gelangt. Daraus kann geschlossen werden, dass auch alle verkürzten Varianten in der Lage sein sollten, die Plasmamembran zu erreichen. Die Topologie-Analyse mit Hilfe des C-terminalen RAS-Reporters konnte das Topologie-

Modell bestätigen. Wie erwartet wurde der temperaturabhängige Wachstumsdefekt einer *cdc25-2* Mutante kompensiert durch die Expression der verkürzten Erd2p-Varianten Erd2.3p, Erd2.5p und Erd2.7p, deren um die RAS-Sequenz verlängerter C-Terminus im Zytoplasma zu liegen kommt. Die Varianten Erd2.1RAS und ERD2.4RAS, deren C-Termini auf der entgegengesetzten Seite der Membran vorliegen, konnten keine Komplementation des Wachstumsdefekts bewirken. Auch mit dieser Methode zeigte die Expression der nach dem sechsten hydrophoben Segment verkürzten Erd2p-Reporterkonstrukte nicht das erwartete Ergebnis. Es konnte ein schwaches Wachstum beobachtet werden, das im Widerspruch zur bestätigten Orientierung der beiden benachbarten Transmembransegmente steht. Eine Erklärung für dieses Verhalten der sechsten Transmembraneinheit könnte in einem durch die Verkürzung des Rezeptors begründeten Defekt bei der Insertion in die Membran zu finden sein. Es ist beschrieben, dass die Insertion von polytopischen Membranproteinen nicht nur nach dem Muster der einzelnen Insertion von Transmembranhelices erfolgen muss, sondern auch in einem paarweisen Einbau durch den Translokation-Komplex verlaufen kann. Es können sogar mehrere Transmembraneinheiten im Translokation-Kanal zurückgehalten werden, bevor sie gemeinsam seitlich in die Membran entlassen werden (Ismail *et al.*, 2008; Skach, 2009). Fehlt die letzte Transmembraneinheit wie im Falle von Erd2.6p, dessen Aminosäurefolge nach der vorletzten potentiellen Transmembraneinheit endet, kann keine paarweise Integration erfolgen. Dies könnte dazu führen, dass die sechste hydrophobe Einheit nicht insertiert werden kann oder nicht stabil in der Membran bleibt. In Einzelfällen wurde bereits nachgewiesen, dass die Insertion einzelner Transmembran-Helices erst nach der vollständigen Translokation des Membranproteins erfolgt. Bei der Reifung von Aquaporinen werden die zweite und vierte Transmembranhelix erst in einem posttranslationalen Reifungsprozess in die Membran integriert, wobei die dritte Transmembraneinheit ihre Orientierung umkehrt (Pitonzo und Skach, 2006). Bei der Verkürzung von Erd2p ist es demnach möglich, dass die Erkennung bzw. der Einbau der sechsten Transmembraneinheit ohne die

folgende siebte Einheit nicht zuverlässig erfolgen kann. Unter Berücksichtigung einer möglichen Fehlorientierung der sechsten hydrophoben Einheit in verkürzten Erd2p-Fragmenten bestätigen die Ergebnisse der *in vivo* Topologie-Analyse über das modifizierte „RAS recruitment“-System das in dieser Arbeit präsentierte Topologie-Modell des HDEL-Rezeptors in *S. cerevisiae*.

Über einen weiteren Ansatz sollte an Erd2p untersucht werden, ob sich die von Brach und Mitarbeitern (2008) in *A. thaliana* etablierte redoxbasierte ratiometrische Fluoreszenzmessung zur Topologie-Analyse in *S. cerevisiae* eignet. Diese Methode basiert auf der Fusion von Transmembranproteinen mit redox-sensitivem GFP (roGFP) und ratiometrischen Aufnahmen. Die Fluoreszenzeigenschaften von ro2GFP ändern sich mit dem Redoxpotential. Durch Glutathion-Dimere im ER werden oxidierende Bedingungen aufrecht erhalten, während im Zytosol monomeres Glutathion reduzierende Bedingungen zur Folge hat (Hwang *et al.*, 1992). In roGFP-Varianten werden diese Unterschiede im Redoxpotential durch Änderungen in den beiden Anregungsmaxima bei 488 bzw. 400 nm umgesetzt. Die Emission ist unabhängig vom Redox-Zustand bei 510 nm maximal. Unter reduzierenden Bedingungen steigt die Emission nach Anregung bei 488 nm und die Emission nach Anregung bei 400 nm fällt (Hanson *et al.*, 2004). Sogenannte ratio-Aufnahmen lassen Rückschlüsse auf die Orientierung des roGFP zur Membran zu. Die sukzessive Verkürzung des K/HDEL-Rezeptors aus *A. thaliana* führte zur wechselseitigen Orientierung des C-terminalen Reporters. Aus diesen Ergebnissen konnte die Topologie des Erd2p-Homologs nach einem  $N_{in} - C_{in}$ -Muster mit sechs Transmembraneinheiten bestätigt werden (Brach *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden die ratiometrischen Änderungen der roGFP-Variante ro2GFP als Antwort auf die Änderungen im umgebenden Redoxpotential zur *in vivo* Topologie-Analyse der verkürzten Erd2p-Varianten eingesetzt. Die exemplarische Untersuchung von ERD2.2ro2GFP, ERD2.4ro2GFP, ERD2.6ro2GFP und ERD2.7ro2GFP ergab ein Insertionsmuster entsprechend der *in silico* Analyse und der *in vivo* Analyse mit dem Glykosylierungsreporter und dem Wachstumsreporter RAS. Als Kontrollen

wurden rein zytosolische bzw. ER-residente ro2GFP-Varianten ohne Transmembrandomänen mitgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden parallel nach Anregung bei 488 bzw. 400 nm vermessen und um die Autofluoreszenz bereinigt. Die aus beiden Intensitäten berechnete Ratio  $ex400/ex488$  liegt bei luminal orientierten Varianten mindestens um den Faktor 4 höher als bei zytosolisch orientierten Varianten. Die schwache Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 400 nm schränkt die Anwendbarkeit des Systems in Hefe stark ein. Sie erreicht maximal den 2,5fachen Wert der Negativkontrolle. Die geringe Fluoreszenzausbeute nach Anregung bei 400 nm wurde bereits bei der reTA-Anwendung in Pflanzenzellen beobachtet (Brach *et al.*, 2008). Die eigenen Ergebnisse zeigen auf, dass die Topologie-Analyse mittels reTA in *S. cerevisiae* nur eingeschränkt möglich ist. Die erhaltenen Daten besitzen eigenständig wenig Aussagekraft, lassen sich aber im Zusammenhang mit den experimentellen Daten der beiden alternativen *in vivo* Methoden interpretieren und bestätigen das Topologie-Modell von Erd2p mit sechs Transmembran-Helices und zytosolischen N- und C-Termini.

### **Endozytose-Motive innerhalb der HDEL-Rezeptor-Sequenz**

Die Clathrin-vermittelte Endozytose von Rezeptoren und Transportern verläuft nach einem geordneten Mechanismus aus Einzelereignissen. Die Bedeutung einzelner Faktoren scheint zwar zwischen Hefe und Säugerzellen unterschiedlich gewichtet zu sein, der grundlegende Ablauf ist jedoch konserviert (Conibear, 2010). Zunächst werden spezifische Signale innerhalb der zytosolischen Domänen der Transmembranproteine durch Adapter erkannt, welche den Kontakt zwischen Frachtmolekülen und der Clathrin-Hülle herstellen. Die Konzentration der vernetzten Proteine an der Endozytosestelle, die sukzessive Anlagerung von Clathrin-Monomeren und die Ausbildung eines Aktinnetzwerks führen zur Änderung der Membrankurvatur. Schließlich wird das endozytotische Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt (Toret und Drubin, 2007). Der weitere intrazelluläre Weg wird ebenso von den Transportsignalen der Fracht bestimmt wie deren erste Erkennung durch die Adapter-Proteine. Inzwischen sind anhand zahlreicher

Rezeptoren und Transporter einzelne Peptidsequenzen identifiziert, welche den im Folgenden beschriebenen Signal-Klassen zugeordnet werden können.

Tyrosin-basierende Signale entsprechen der Abfolge YXXΦ, wobei Y für Thyrosin steht, X eine beliebige und Φ eine sperrige hydrophobe Aminosäure bedeutet. Leucin-basierende Signale zeigen ein Konsensus-Motiv der Formen [DE]XXXL[LI] oder DXXLL. In Säugerzellen sind YXXΦ und [DE]XXXL[LI] die beiden Motive, welche am C-Terminus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vorherrschen und von den Adapter-Protein-Komplexen AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4 erkannt werden. DXXLL-Motive binden an eine andere Adapter-Familie, die GGAs (Bonifacino und Traub, 2003). Signale des Typs NPXD, wie sie z.B. am C-Terminus des LDL-Rezeptors vorkommen, werden sowohl von GGAs, als auch von AP-2-Komplexen erkannt (Chen *et al.*, 1990). Motive nach dem Muster NPF oder NPF[X]<sub>1,2</sub>D, welche u.a. bei den beiden Mating-Faktor-Rezeptoren der Hefe identifiziert wurden, können durch eine Vielzahl an Proteinen mit EH- oder SHD-Domänen („Eps15 homology“ bzw. „Sla1p homology“) erkannt werden (Salcini *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 2002).

Die Mating-Faktor-Rezeptoren lieferten auch den ersten Hinweis auf ein weiteres, von den beschriebenen Peptid-Motiven abweichendes Signal. So können posttranslationale Modifikationen in Form einer Ubiquitinierung die Endozytose steuern (Hicke und Riezman 1996; Roth und Davis, 2000). Die Erkennung verläuft dabei über UIMs („ubiquitin interacting motifs“), welche auch in Epsinen und Epsin-ähnlichen Adaptoren vorkommen (Bonifacino und Traub, 2003).

Anhand von Sequenzanalysen konnten innerhalb von Erd2p Endozytose-motive am N-Terminus, innerhalb eines zytoplasmatischen Loops und am C-Terminus des Rezeptors identifiziert werden. Dem N-terminalen Methionin folgt in der Erd2p-Sequenz unmittelbar ein NPF-Motiv. Nach einer *in silico* Vorhersage an Erd2p, welche mit Hilfe des SignalP 3.0-Servers (Bendtsen *et al.*, 2004) durchgeführt wurde, liegt kein abspaltbares Signalpeptid vor, der N-Terminus bleibt also unprozessiert. Entsprechend dem in dieser Arbeit experimentell bestätigten Topologiemodell liegt der N-Terminus von Erd2p zytoplasmatisch vor und ist somit für zytosolische

Adaptoren des Endozytose-Apparats zugänglich. In dieser Arbeit wurde zunächst die Funktionalität einer NPF-freien Erd2p-Variante untersucht. Über PCR-Mutagenese wurde das N-terminale NPF-Motiv vollständig deletiert. Das Derivat ERD2-NPF wurde plasmidgetrieben in dem  $\Delta$ erd2-Hefestamm YA12 exprimiert. YA12 zeigt zwar ein verlangsamtes Wachstum, bleibt aber durch die Expression des „suppressor of erd2 deletion“-Gens *SEC12* lebensfähig. Nach Verlust des *SEC12*-tragenden Plasmids über FOA-Selektion konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsdefekt einer  $\Delta$ erd2-Mutante durch die Expression von *ERD2-NPF* komplementiert wurde. Die von Townsley und Mitarbeitern identifizierte, essentielle Funktion des Rezeptors kommt bei der Retention ER-residenter Proteine zum Tragen (Townsley *et al.*, 1994). Eine Beteiligung des NPF-Motivs an der essentiellen Golgi-ER-Rückführung kann demnach durch die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* YA ERD2-NPF ausgeschlossen werden. Der wie beschrieben konstruierte Stamm YA ERD2-NPF exprimiert einzig die NPF-freie Erd2p-Variante und besitzt keine wildtypische *ERD2*-Genkopie. An YA ERD2-NPF und YA ERD2, einem konstruierten *erd2*-Deletionsstamm mit Expression von wildtypischem *ERD2*, wurden Agardiffusionstests mit dem Proteintoxin K28 durchgeführt. Die Ergebnisse belegten, dass die Deletion des NPF-Motivs im HDEL-Rezeptor in Hefe eine partielle Resistenz gegen das Toxin vermittelt. In Kombination mit der bestätigten Funktionalität des Rezeptors lässt sich somit folgern, dass das NPF-Motiv eine Rolle bei der Endozytose des Rezeptor/Toxin-Komplexes, nicht aber beim retrograden Transport von K28 spielt. Damit konnte erstmalig *in vivo* die Bedeutung dieses N-terminalen Endozytosesignals für die K28-Sensitivitätsvermittlung in Hefe gezeigt werden. Im Gegensatz zu YA12, dem Stamm ohne Erd2p, wurde in YA ERD2-NPF keine vollständige Resistenz erzielt. Die Restsensitivität deutet auf einen redundanten Endozytosemechanismus hin, wonach ein zweites Signalsystem die Internalisierung steuern kann, wenn die NPF-Adapter-Interaktion ausfällt. Kürzliche Studien von Kieken und Mitarbeitern an modifizierten NPF-Motiven deuten darauf hin, dass für eine optimale EH-Bindung proximale saure Reste eine entscheidende Rolle spielen (Kieken *et al.*, 2010). Am N-Terminus von

---

Erd2p folgt die nächste saure Aminosäure erst fünf Positionen nach dem NPF-Motiv. Ein solches saures Cluster fehlt im HDEL-Rezeptor in unmittelbarer Nähe des Motivs. So steht zu vermuten, dass die Bindung an Adapter-Proteine mit EH-Domänen über NPF zwar erfolgt, die Affinität der interagierenden Partner jedoch vergleichsweise schwach ist. Das N-terminale NPF-Motiv ist folglich an der Internalisierung der Erd2p/K28-Komplexe beteiligt, stellt jedoch nicht die Hauptkomponente des Endozytosemechanismus dar. Vorstellbar sind zwei Szenarien; entweder existiert ein zweiter, redundanter oder sogar effizienterer Mechanismus, der unabhängig von dem NPF-Signal arbeitet oder es ist ein primärer Prozess zu erwarten, der durch ein funktionelles NPF-Signal verstärkt werden kann.

Ein weiteres, tyrosinbasiertes Endozytosemotiv der Form YXXΦ in einem zytoplasmatischen Loop von Erd2p, Y<sub>90</sub>NEM<sub>94</sub>, erwies sich kürzlich als nicht beteiligt an der essentiellen Funktion des Rezeptors bei der ER-Retention, noch an der K28-Sensitivitätsvermittlung (Gießelmann, persönliche Mitteilung). Diese Erkenntnis wirft die Frage auf, auf welche Weise die AP2-Beteiligung an der K28-Endozytose gedeutet werden kann. Die bereits von Heiligenstein beobachtete Bedeutung der Untereinheiten Apl1p, Apm4p und Aps2p des AP2R-Komplexes bezüglich der K28-Sensitivität von Zielzellen wurde kürzlich anhand eines Screenings an Hefemutanten auf veränderte K28-Sensitivität bestätigt (Heiligenstein, 2008; Carroll *et al.*, 2009). Dies ist die erste Beobachtung, die dem AP2-Komplex in Hefe eine Bedeutung bei der Endozytose zuschreibt. Der Erkennungsmechanismus endozytotischer Fracht durch AP2 in Hefe konnte im Detail noch nicht nachvollzogen werden. Im Falle von K28 kann die Erkennung des Rezeptors nicht an einem klassischen AP2-Bindemotiv der Form YXXΦ, DE]XXXL[LI] oder NPXY erfolgen, sondern muss einem alternativen, bisher noch nicht beschriebenen Erkennungsprinzip folgen.

Neben Peptidmotiven können auch posttranslationale Modifikationen wie die Ubiquitinierung die Endozytose steuern. Klassischerweise erfolgt die Ubiquitinverknüpfung an Lysinresten (Hershko und Ciechanover, 1992). Die Erd2p-Sequenz weist zahlreiche Lysinreste auf. Nach experimenteller

Bestätigung der Topologie konnten die zytoplasmatischen Positionen selektiert werden, welche für Ubiquitin-bindende Adaptoren des Endozytoseapparats zugänglich sind. Zwischen den hydrophoben Regionen 3 und 4 bzw. 5 und 6 liegen jeweils zwei Lysinreste in hydrophilen Schleifen, welche nach der ermittelten Topologie zytoplasmatisch orientiert sind. Besonders auffällig jedoch erwies sich der zytosolische C-Terminus des Rezeptors. Hier kommen in einem Cluster vier Lysinreste vor, welche in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Dieses Cluster wurde in Studien zur Funktion von Erd2p näher untersucht. Bei einer Steuerung der Rezeptor/Toxin-Internalisierung nach einem klassischen Ubiquitinierungsmechanismus am C-Terminus des Rezeptors sollte die Deletion der Lysinreste eine Endozytose verhindern und damit eine Resistenz gegen K28 bewirken. Über PCR-Mutagenese wurde ein *ERD2*-Derivat hergestellt, das für ein C-terminal Lysin-freies Erd2p kodiert. In dieser Rezeptor-Variante Erd2pK/R sind die vier Lysinreste an den Positionen 208, 213, 216 und 219 durch Arginin ersetzt. Die Ergebnisse der Funktionalitätstests an Erd2pK/R bestätigten einen zweiten Aufnahmemechanismus, der dem NPF-Signal übergeordnet ist. Der Austausch dieser Lysinreste zu Arginin führt zu einem vollständigen Verlust der K28-Sensitivität. Die Kompensation des Wachstumsdefekts der  $\Delta$ *erd2*-Mutante durch *ERD2K/R* belegt, dass die ER-Retentionsfunktion dieser Erd2p-Variante unbeeinträchtigt ist. Die Veränderungen im C-Terminus wirken sich demnach auf die Endozytose des HDEL-Rezeptors aus.

Die Deletion des dem Lysin-Cluster vorausgehenden, potentiell phosphorylierten Threoninrests 207 oder dessen Austausch nach Alanin oder Leucin wirkte sich nur schwach auf die K28-Sensitivität aus. Diese Ergebnisse stellen heraus, dass eine potentielle Phosphorylierung am C-Terminus des HDEL-Rezeptors nicht im gleichen Maße an der Endozytose beteiligt ist, wie dies bei der Aufnahme des mating-Faktor-Transporters Ste6p der Hefe der Fall ist. Für die Ubiquitinierung und Endozytose dieses Transporters nach dem „PURE“-Signalweg ist die Phosphorylierung absolut notwendig (Kelm *et al.*, 2004). Im Bereich des C-Terminus von Erd2p existiert keine weitere

---

potentielle Phosphorylierungsstelle. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich eine Phosphorylierung in einem zytoplasmatischen „Loop“ die Voraussetzung für die Ubiquitinierung des HDEL-Rezeptors darstellt. Künftige Mutagenese-Studien, in denen alle potentiellen Phosphorylierungsstellen einzeln und in Kombiantion deletiert sind, könnten Aufschluss geben, ob eine Phosphorylierung an mehreren Positionen innerhalb des Rezeptors der Ubiquitinierung entsprechend dem „PURE“-Prinzip vorausgehen muss.

Im Mittelpunkt weiterführender Versuche stand die Frage nach dem Mechanismus der Ubiquitinierung von Erd2p. Ein direkter Nachweis über Western-Analyse erwies sich leider als experimentell nicht durchführbar. Dies könnte durch eine zu geringe Kopienzahl an ubiquitinierten Rezeptoren bedingt sein. Die Aufgabe von Erd2p an der Plasmamembran, welche mit einer Ubiquitinierung verbunden ist, stellt vermutlich nur eine sekundäre Funktion des Rezeptors im Vergleich zur Vermittlung der ER-Retention dar. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass nur eine geringe Anzahl an HDEL-Rezeptoren ubiquitiniert vorliegt, welche sich dem Nachweis in der Western-Analyse entzieht. Somit ist bislang auch kein Aufschluss über Mono- oder Polyubiquitinierung zu erreichen. Um dennoch die postulierte Ubiquitinierungsreaktion von Erd2p durch Rsp5p experimentell bestätigen zu können, sollte in dieser Arbeit ein direkter *in vivo* Nachweis der Erd2p/Rsp5p-Interaktion mit Hilfe des BiFC-Assays erbracht werden. Im BiFC-Assay wird die Rekonstitution zweier Fragmente eines Fluoreszenzproteins unter Bildung eines funktionellen Fluorophors zum Nachweis der Interaktion zweier Proteine *in vivo* genutzt (Hu *et al.*, 2002). Das System gehört zu einer Vielzahl an Nachweismethoden über eine Protein-Rekonstitution und wurde inzwischen erfolgreich am Beispiel der gelb bzw. grün fluoreszierenden Proteine YFP und GFP (Ozawa, 2009; Bracha-Drori *et al.*, 2004; Cabantous *et al.*, 2005) eingesetzt. Das von DsRed, einem tetrameren rot fluoreszierenden Protein abgeleitete monomere mCherry weist einen entscheidenden Vorteil gegenüber vergleichbaren Fluoreszenzproteinen auf. Seine Fluoreszenzeigenschaften sind weniger anfällig in N- sowie C-terminaler

Position in Fusionsproteinen (Shaner *et al.*, 2004). Die Spaltung von mCherry zwischen den Aminosäuren 159–160 resultiert in einem Proteinpaaar, das erstmalig von Fan und Mitarbeitern genutzt wurde. Mit MN (N-terminales mCherry-Fragment; AS 1 bis 159) und MC (C-terminales mCherry-Fragment; AS 160 bis 236) wurde die Interaktion zwischen LTag, dem „large T antigen“ von SV40 und dem humanen p53 nachgewiesen. Die kurze Reifungsdauer und die Anregung und Emission bei hoher Wellenlänge, wodurch weniger Energie in den analysierten Zellen deponiert wird, sind weitere Vorteile von mCherry als Reporter der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (Fan *et al.*, 2008). Basierend auf den von Schäuble und Schorr erstellten Konstrukten wurden Vektoren zur induzierbaren Expression von *ERD2*- und *RSP5*-Fusionen hergestellt (Diplomarbeiten Schäuble 2008 und Schorr 2009). Die Koexpression von Erd2MN, einer Erd2p-Variante mit dem N-terminalen mCherry-Fragment am C-Terminus und MCRsp5, einer Rsp5p-Variante mit dem C-terminalen mCherry-Fragment am N-Terminus des Fusionsproteins führte zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz. Die Intensität des Signals konnte durch Zugabe von K28-Toxin ins Außenmedium noch deutlich gesteigert werden. Dies bestätigt die Interaktion von Erd2p mit Rsp5p, welche durch die externe Zugabe des Liganden gesteigert werden kann und weist abermals auf die Rsp5p-vermittelte Ubiquitinierung von Erd2p als Signal zur Internalisierung des Erd2p/K28-Komplexes hin.

Neben Rsp5p wurde auch das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc4p auf eine Interaktion mit Erd2p untersucht. Trotz der in K28-Sensitivitätstests bestätigten Funktionalität der eingesetzten Ubc4p-mCherry-Fusion konnte keine Interaktion mit dem Rezeptor nachgewiesen werden. Möglicherweise wird Erd2p direkt von Rsp5p erkannt, so dass Ubc4p keine Rolle bei der initialen Ubiquitinierungsreaktion spielt, sondern erst bei Oligo- oder Polyubiquitinierung beteiligt ist. Rsp5p gehört wie sein humanes Homolog Nedd4 zum Typus der HECT-Domänen-Ligasen. Im Gegensatz zu einer zweiten Klasse von Ubiquitin-Ligasen, den RING-Finger-E3s, welche eher als Gerüst die Interaktion von E2 und Substrat ermöglichen, ist bei der HECT-Domänen-vermittelten Ubiquitinierungsreaktion keine direkte Interaktion des E2 mit

dem zu ubiquitinierenden Substrat notwendig (Belgareh-Touze *et al.*, 2008). Rsp5p kann demnach das Ubiquitinmolekül unmittelbar übertragen, so dass eine Interaktion mit dem E2-Enzym Ubc4p und Erd2p nicht zwingend notwendig ist. Eine weitere Erklärung bietet die Redundanz von Ubc4p mit anderen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen im Gegensatz zu Rsp5p, welches kein funktionelles Isozym in *S. cerevisiae* besitzt. Ubc4p und Ubc5p sind zentrale Komponenten der zellulären Stressantwort, zeigen große Sequenzübereinstimmung und komplementieren sich (Seufert und Jentsch, 1990). Es steht also zu vermuten, dass bei Deletion von *UBC4* das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc5p die Funktion übernehmen kann. Diese Redundanz erklärt, weshalb bei einer Einfachmutante keine vollständige K28-Resistenz ausgelöst wird und könnte auch der Grund sein, warum kein deutliches Signal im BiFC-System für die Interaktion von Ubc4p mit Erd2p detektierbar ist.

Der Nachweis der Interaktion von Rsp5p mit Erd2p im BiFC bestätigt die Ubiquitinierung nicht direkt, liefert aber einen weiteren Hinweis darauf, dass diese Ubiquitin-Ligase die Internalisierung von Erd2p bei der K28-Aufnahme steuert. Insbesondere die Tatsache, dass die Inkubation mit K28-Toxin eine Signalverstärkung im BiFC-System zur Folge hat, bekräftigt die Beteiligung von Rsp5 an der K28-Internalisierung über einen ubiquitinierten Rezeptor Erd2p. Zunächst erscheint eine Rsp5p-Interaktion mit Erd2p unwahrscheinlich, da dem Rezeptor das klassische Erkennungsmotiv PY für die WW-Domänen der Ubiquitin-Ligase fehlen. Berücksichtigt man jedoch neuere Erkenntnisse, nach denen Adapter die Bindung der Ligase an ihre Substrate vermitteln können, wird der Mechanismus der Erkennung klarer. Während lange Zeit vermutet wurde, dass die Erkennung von Substraten der Nedd4-ähnlichen E3-Ligasen ausschließlich mit Hilfe der WW-Domänen erfolgt, wird inzwischen deutlich, dass sich dieses Prinzip auf die Regulation von Ionenkanälen und Connexin beschränkt (Leon und Haguenaer-Tsapis, 2009). Die Zahl an Beispielen für eine Adapter-bedingte E3-Interaktion mit ihren Substraten steigt stetig. Die Beteiligung von Bul1/2p an der Ubiquitinierung und Internalisierung von Gap1p („general amino acid permease“) und dem Kupfer-Transporter Ctr1p

sind die ersten Belege für PY-tragende Adapter. Sogenannte ARTs („arrestin related trafficking adaptors“) bilden in der Hefe *S. cerevisiae* eine neue Klasse von Proteinen mit PY-Motiven, deren Beteiligung bei der Internalisierung von Transportern wie Can1p, Fur4p, Hxt6p, Itr1p, Lys1p, Mup1p, Smf1p und Tat2p (Transporter für Arginin, Uracil, Glucose, Inositol, Lysin, Methionin, Mangan bzw. Tryptophan) nachgewiesen wurde (Lin *et al.*, 2008; Nikko und Pelham, 2008). Strukturell sind sie verwandt mit den „echten“ humanen Arrestinen, welche mit dem phosphorylierten C-Terminus aktivierter Rezeptoren interagieren und Adapter-Proteine sowie Clathrin rekrutieren (Aubry *et al.*, 2009). Die zehn Art-Proteine interagieren mit Rsp5p, werden selbst ubiquitiniert und binden an Transmembranproteine, wodurch diese wiederum durch Rsp5p modifiziert werden können. Der eingeleitete Endozytose-Mechanismus kann Clathrin- und AP2-abhängig erfolgen oder unabhängig von diesen beiden Komponenten unter Beteiligung von Epsinen (Mittal und McMahon, 2009).

Die eigenen Ergebnisse belegen eine Beteiligung der Art-Proteine Art2, 8 und 9 an der Internalisierung von K28. Die Deletionsmutanten dieser ART-Gene zeigten zwar nur einen geringen Sensitivitätsverlust gegen K28-Toxin im Agardiffusionstest, der Effekt kann aber durch die Redundanz der Art-Proteine überdeckt sein (Nikko und Pelham, 2008). Die Rolle der Schlüsselkomponente zur Vermittlung der Rsp5p-Interaktion mit Erd2p bei der K28-Aufnahme wird demnach nicht von einem spezifischen Art-Protein, sondern von mehreren Adaptern der Art-Familie wahrgenommen. Die in dieser Arbeit festgestellte Bedeutung des C-terminalen Threoninrests, dessen Deletion zu einer verminderten K28-Sensitivität führt, liefert einen Hinweis darauf, wie die Erkennung des Rezeptors durch die Art-Proteine erfolgt. Für Smf1p wurde bereits bestätigt, dass eine terminale Phosphorylierung die Erkennung des Transporters durch Art2 und Art8 ermöglicht (Nikko *et al.*, 2008). Ungeachtet der unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften von Smf1p und Erd2p zeigt sich mit der Phosphorylierung, der Erkennung durch Art2 und 8 sowie der Rsp5p-Interaktion an einem zytosolischen Terminus eine erstaunliche Übereinstimmung im Ubiquitin-abhängigen Endozytose-Mechanismus beider

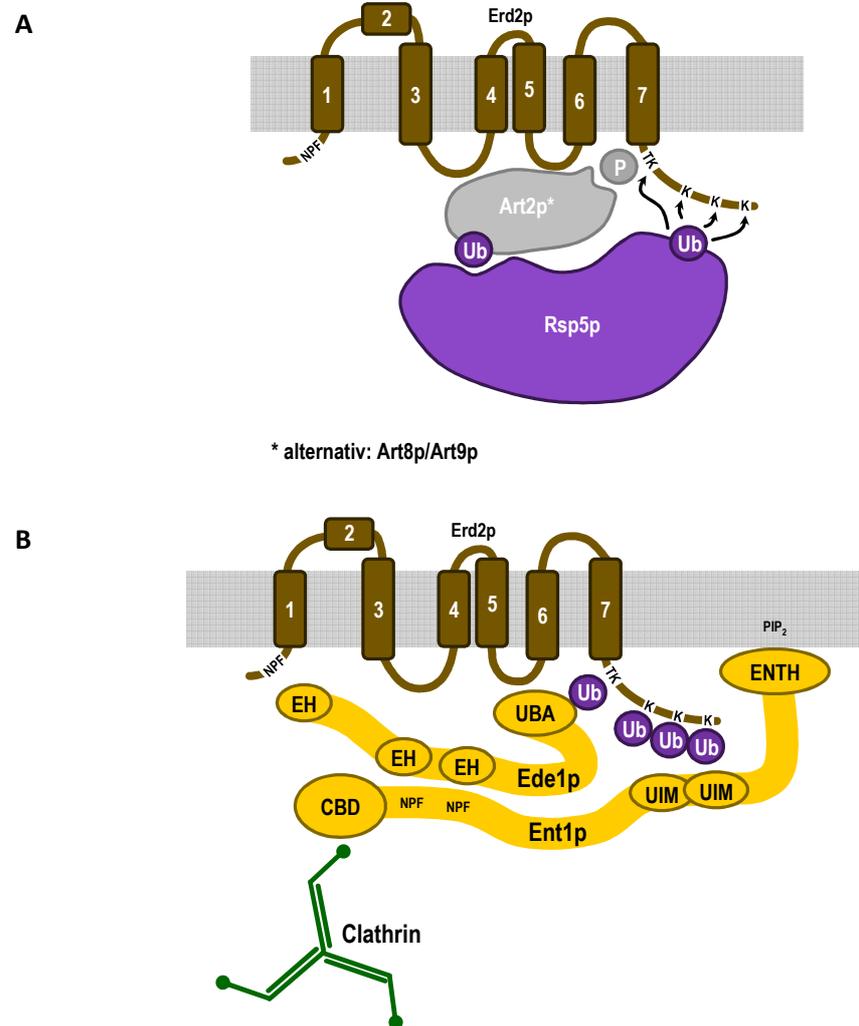
Transmembranproteine. Die Bedeutung des C-terminalen Threonin-Restes und des Lysin-Clusters für die Rsp5p-abhängige Ubiquitinierung von Erd2p nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell ist in Abbildung 47 dargestellt. Nachdem Erd2p am C-Terminus ubiquitiniert vorliegt, muss eine Erkennung dieses Signals durch akzessorische Faktoren der Endozytose-Maschinerie erfolgen. Ubiquitin wird von einer Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher Proteine mit Hilfe von Ubiquitin-bindenden Domänen erkannt. Die größte Klasse Ubiquitin-bindender Domänen stellen  $\alpha$ -helikale Strukturen. UBA-Domänen („ubiquitin associated“) waren die ersten Domänen für die eine Ubiquitin-Bindung gezeigt wurde. Sie weisen eine drei-Helix-Bündel-Konformation auf und spielen vorrangig eine Rolle in Ubiquitinierungskaskaden (Hofmann und Bucher, 1996). UIMs („ubiquitin interacting motifs“) in Endozytose-Proteinen erkennen ubiquitinierte Fracht über eine einzelne  $\alpha$ -Helix (Polo *et al.*, 2002). CUE-Domänen („coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation“) und GAT-Domänen („golgi-localized, gamma-ear containing, ADP-ribosylation-factor-binding protein and target of Myb“) spielen vorrangig eine Rolle bei Prozessen abseits der Plasmamembran. Daneben existieren noch zahlreiche andere Ubiquitin-bindende Motive mit unterschiedlichen zellulären Funktionen (Hurley *et al.*, 2006).

Von Aguilar und Mitarbeitern (2003) wurde ein Modell aufgestellt, nachdem Epsine eine Schlüsselrolle als Adaptoren zwischen ubiquitinierten Frachtmolekülen und der Endozytosemaschinerie an der Plasmamembran spielen. Im Einzelnen wurde in *S. cerevisiae* gezeigt, dass Ent1 in einem UIM-abhängigen Mechanismus an Ubiquitin bindet und über die ENTH-Domäne an Phosphoinositide der Plasmamembran. Ob beide UIMs von Ent1 gemeinsam eine Ubiquitineinheit binden oder verschiedene Einheiten in einem multivalenten Komplex binden, ist noch nicht geklärt. Auch für Ede1p existiert ein Ubiquitin-abhängiger Rekrutierungsprozess an die Plasmamembran, der durch die Interaktion mit Ent1p über eine EH-Domänen/NPF-Motiv-Interaktion verstärkt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die C-terminale CBD („clathrin binding domain“) in Ent1p ausreicht, um die

Bindung an die terminalen Domänen von Clathrin zu vermitteln (Aguilar *et al.*, 2003). Dieses Modell spricht für eine Vernetzung von ubiquitinierten Membranrezeptoren über Adapter-Komplexe mit dem Clathrin-„coat“.

Das in Abbildung 47 dargestellte Modell der Erkennung von Erd2p über Adaptoren beruht nicht nur auf der in dieser Arbeit gezeigten Beteiligung der Art-Proteine an der K28-Aufnahme. Es gehen auch frühere Erkenntnisse von Heiligenstein ein, nach denen die Deletion der Clathrin-Untereinheiten Chc1p („clathrin heavy chain“) zu einer K28-Resistenz führt. Die K28-Sensitivität in einer  $\Delta ede1$ -Mutante ist stark vermindert (Dissertation Heiligenstein, 2008). Dieser Effekt wurde bereits bei der Aufnahme des  $\alpha$ -Faktors und der Internalisierung der Uracil-Permease beobachtet (Gagny *et al.*, 2000). Eine *ENT1*-Deletion zeigte keinen Einfluss auf die K28-Sensitivität. Ent1p übernimmt seine Funktion innerhalb der Zelle redundant mit Ent2p, so dass ein Effekt in einer Einzelmutante nicht zu erwarten ist. Die Doppelmutante erweist sich als letal (Wendland *et al.*, 1999). Ein Nachweis der Ent1p- und Ent2p-Beteiligung wäre demnach nur mit temperatursensitiven Mutanten möglich. Diese Methode kann aber wegen der Instabilität von K28 bei hohen Temperaturen nicht angewandt werden. Die Beteiligung von Ede1p an der K28-Aufnahme deutet jedoch darauf hin, dass der Aufnahme-Prozess des Erd2p/K28-Komplexes dem klassischen, Clathrin-abhängigen Weg über Interaktion mit den Adaptoren Ent1/2p und Ede1p folgt. Komponenten der folgenden Schritte im intrazellulären Transport des Rezeptor/Toxin-Komplexes sind bereits durch das genetische Screening anhand von Deletionsmutanten identifiziert worden. Das durch *SAC6* kodierte Aktin-bündelnde Protein Fimbrin ist notwendig für die Internalisierung des  $\alpha$ -Faktors und ebenso für die K28-Aufnahme. Eine  $\Delta sac6$ -Mutante erwies sich als vollständig resistent gegen K28 (Heiligenstein, 2008). Andere Faktoren des Endozytose-Prozesses, welche eine Rolle bei der Ausbildung der Clathrin-Hülle, der Vesikel-Abschnürung und dem Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts spielen, zeigten zum Teil bei Deletion nur eine reduzierte Sensitivität. Dies belegt abermals, dass bei der Endozytose des Erd2p/K28-Komplexes viele verschiedene Mechanismen auf komplexe Weise ineinandergreifen und zum Teil redundante Wege existieren,

die von dem Toxin auf seinem Weg in die Zelle genutzt werden (Carroll *et al.*, 2009).



**Abbildung 47: Modell der Erd2p-Erkennung durch Adaptern zur Ubiquitinierung und Endozytose.**

**(A) Art-vermittelte Interaktion von Rsp5p mit Erd2p.** Die Erkennung von Erd2p (dargestellt in braun, mit den Transmembranhelices 1, 3, 4, 5, 6 und 7) durch die Ubiquitin-Ligase Rsp5p erfolgt nicht direkt, sondern unter Vermittlung durch Adaptern. Art2p erkennt den phosphorylierten C-Terminus von Erd2p und wird selbst an einer Ubiquitinierung von Rsp5p erkannt. Die Redundanz der Art-Proteine erlaubt auch die Erkennung von Erd2p durch die Adapter Art8p und Art9p. Rsp5p katalysiert die Ubiquitinverknüpfung im Bereich des C-terminalen Lysinclusters von Erd2p.

**(B) Erkennung des Rezeptors Erd2p durch Clathrin-Adaptern.** Das am N-Terminus von Erd2p vorliegende NPF-Motiv wird durch EH-Domänen von Ede1p erkannt. Die UIM-Domänen von Ent1p interagieren mit Erd2p an dem ubiquitinierten C-terminalen Lysincluster des Rezeptors. Der Komplex wird durch die Interaktion der NPF-Motive von Ent1p und den EH-Domänen von Ede1p stabilisiert. Die Assoziation mit der Plasmamembran kann durch die Bindung der ENTH-Domäne von Ent1p an Phosphatidylinositolphosphat (PIP<sub>2</sub>) verstärkt werden. Die Clathrin-Bindedomäne des Adaptors vermittelt die Bindung des Komplexes an das Hüllprotein Clathrin.

### Vergleich der K28-Aufnahme mit der Endozytose anderer Toxine

Der Aufnahmemechanismus von K28 über Erd2p in sensitiven Hefen weist trotz einiger Unterschiede starke Ähnlichkeit zur Internalisierung von bakteriellen und pflanzlichen Toxinen auf. Zahlreiche pathogene Bakterien setzen Toxine frei, welche in der Lage sind, ihre eigene Aufnahme in eine Zielzelle zu steuern und im Zytosol an Schlüsselkomponenten anzugreifen. Dieser Mechanismus setzt voraus, dass die Toxine auf einer bestimmten Ebene die Zellmembran des Wirts überwinden. Proteintoxine der A-B-Familie bestehen aus mindestens einer katalytischen A- und einer Zell-bindenden B-Untereinheit (Barth *et al.*, 2004). Die Zelloberflächenrezeptoren der AB-Toxine gehören verschiedenen Stoffklassen an und auch der Ablauf der Endozytose unterscheidet sich im Detail. Ein Vergleich der A-B-Toxine bezüglich ihrer Aufnahme-Mechanismen wird in Tabelle 17 gezogen.

Cholera-Toxin (CT) als klassisches Beispiel eines AB<sub>5</sub>-Toxins bindet über seine B-Untereinheiten an die Zellmembran und wird über Endosomen und das Trans-Golgi-Netzwerk retrograd bis hin zum ER retrograd transportiert. Im ER wird das Toxin von der Proteindisulfidisomerase erkannt und entfaltet. Während K28 nur einen Teil der ERAD-Maschinerie für seine Translokation in das Zytosol nutzt, beruht die Retrotranslokation der CTA-Untereinheit vollständig auf dem ERAD-Komplex. Die ADP-Ribosyltransferase-Funktion von CTA aktiviert im Zytosol ein heterotrimeres G-Protein. In Folge dessen wird die Adenylatzyklase stimuliert, es kommt zum Anstieg des cAMP-Niveaus, wodurch ein massiver Chlorid- und Wasserausstrom initiiert wird (Chinnapen *et al.*, 2006). Erste Untersuchungen zur Endozytose des Cholera-Toxins (CT) deuteten auf eine reine Aufnahme über Caveolae hin, wo die Ganglioside als Rezeptoren des Toxins im Überfluss vorkommen (Montesano *et al.*, 1982; Parton, 1994). Inzwischen ist bekannt, dass die CT-Aufnahme über zwei weitere Wege erfolgen kann; über Clathrin-abhängige Endozytose und über einen non-Caveolae/non-Clathrin-Mechanismus in tubulären Strukturen (Torgersen *et al.*, 2001; Kirkham *et al.*, 2005). Alle drei Wege basieren auf einem gemeinsamen, Lipid-basierten Sortiermechanismus, der das an Ganglioside gebundene Toxin in lipid raft-Mikrodomänen konzentriert

(Chinnapen *et al.*, 2006). Es wurde beschrieben, dass im trans-Golgi das am C-Terminus der A2-Kette lokalisierte KDEL-Signal durch den KDEL-Rezeptor erkannt wird und den retrograden Weg des Toxins bis zum ER vermittelt (Majoul *et al.*, 1996 und 1998). K28- und Cholera-Toxin nutzen demnach beide den ER-Rückhalterezptor als Vehikel für den retrograden Transport innerhalb der Zielzelle. Neueren Untersuchungen zufolge ist für das Cholera-Toxin das KDEL-Signal jedoch nicht unabdingbar nötig für den retrograden Transport, sondern maximiert lediglich die Transport- und Wirkungseffizienz des Toxins. CT kann einen direkten Weg vom Trans-Golgi-Netzwerk zum ER nutzen, der unabhängig von COPI-Vesikeln arbeitet (Chen *et al.*, 2002; Lencer *et al.*, 1995). Das von enterotoxischen *Escherichia coli*-Stämmen produzierte „heat labile toxin“ (LT) zeigt mehr als 80 %ige Sequenzidentität zum Cholera-Toxin und besitzt ebenfalls ein C-terminales ER-Retentionsmotiv. Im intrazellulären Transport sowie der Wirkung stimmt LT größtenteils mit dem Cholera-Toxin überein, auch wenn die Mechanismen bisher nicht detailliert untersucht sind (Fan *et al.*, 2004). LT kann in Zellen sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Apoptose auslösen; der durch das Cholera-Toxin ausgelöste Apoptose-Mechanismus ist bisher noch nicht näher charakterisiert (Tamayo *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010).

Shiga-Toxine (STx) bilden eine Subfamilie der AB-Toxine, die von *Shigella dysenteriae* und enterohaemorrhagischen *E. coli* Stämmen produziert werden (Johannes und Römer, 2010). Sie zeigen den klassischen AB<sub>5</sub>-Aufbau mit einer pentameren B-Ringstruktur, welche die Bindung an die Zelloberfläche übernimmt. Die nicht-kovalent mit dem B-Ring verbundene A-Untereinheit besitzt die katalytische Aktivität und inaktiviert eukaryotische Ribosomen. Als Rezeptor nutzt STx Glykosphingolipide und ist damit stark abhängig von der Membranzusammensetzung (Sandvig *et al.*, 2010). Shiga-Toxine können Clathrin-abhängig und Clathrin-unabhängig über einen Toxin-induzierten Rezeptor-Clustering-Mechanismus aufgenommen werden. Der Transport von Endosomen zum TGN jedoch kann nur mit Clathrin-beschichteten Vesikeln erfolgen (Wälchli *et al.*, 2009; Römer *et al.*, 2007). Nach Durchlaufen des retrograden Wegs durch den Golgi bis zum ER wird das Toxin teilweise

entfaltet, die A1-Untereinheit wird durch den Sec61-Komplex ins Zytosol transloziert. Dort entfaltet sie ihre RNA-N-Glykosidase-Aktivität, wodurch ähnlich wie durch Ricin A eine Adenin-Base im  $\alpha$ -Sarcin/Ricin-Loop der rRNA eukaryotischer Ribosomen gespalten wird (Saxena *et al.*, 1989). STx zeigt einen zweiten Wirkungsmechanismus, der Ähnlichkeiten zu dem viral kodierten Hefetoxin K28 aufweist. Durch STx-Einfluss können in eukaryotischen Zellen die Apoptose-induzierenden Caspasen 8 und 3 aktiviert und der programmierte Zelltod eingeleitet werden (Lee *et al.*, 2008).

Bei Ricin handelt es sich um ein pflanzliches AB-Toxin, das in seinem Aufbau aus einer A- und einer B-Kette (RTA und RTB) K28 gleicht. RTA übt seine Ribosomen-inaktivierende Aktivität nach dem gleichen Mechanismus wie das Shiga-Toxin aus. RTB ist ein Lektin, das an eine Vielzahl an Glykoproteinen und Glykolipiden der Zelloberfläche binden kann (Hartley und Lord, 2004). Die Aufnahme von Ricin kann sowohl Clathrin-abhängig als auch -unabhängig erfolgen (van Deurs *et al.*, 1985; Moya *et al.*, 1985). Auch für den Weg aus den Endosomen zum ER existieren mehrere Wege, die von Ricin gleichzeitig genutzt werden können. Ricin besitzt kein KDEL-Signal, kann aber über die Bindung an Calretikulin über einen COPI-vermittelten Weg über Golgi-Kompartimente zum ER transportiert werden. Dieser Weg scheint jedoch nicht die einzige Route zum retrograden Transport dieses Pflanztoxins zu sein (Spooner *et al.*, 2006). Die Dislokation der Ricin-A-Kette erfolgt nach dem klassischen ERAD-L-Weg (Li *et al.*, 2010). Im Zytosol angelangt, inaktiviert RTA spezifisch die eukaryotischen Ribosomen (Endo *et al.*, 1978).

Das *Pseudomonas* Exotoxin A (PEx) beeinträchtigt ebenfalls die Proteinsynthese und löst gleichzeitig die Caspase-vermittelte Apoptose aus (Hafkemeyer *et al.*, 1999). Die B-Untereinheit des Dimers bindet ähnlich wie K28 nicht an Glykolipide sondern an ein Zelloberflächenprotein. Als Rezeptoren werden der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Rezeptor und die beiden Rezeptoren LRP 1 und LRP 1B („low-density lipoprotein receptor-related protein“) benutzt. Die Endozytose erfolgt Clathrin-abhängig oder in einem Lipid-abhängigen Prozess. Im retrograden Transport ist eine weitere Parallele zwischen K28 und PEx erkennbar. Das KDEL-ähnliche Signalmotiv REDLK am

C-Terminus von PEx vermittelt den retrograden Transport bis zum ER (Jackson *et al.*, 1999). Daneben scheint ein weiterer, direkter Weg von frühen Endosomen zum ER zu existieren, der über DRM-Strukturen erfolgt (Smith *et al.*, 2006). Nach der ER-Zytosol-Dislokation entfaltet die katalytische Untereinheit des *Pseudomonas* Exotoxins ihre Wirkung durch die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (Deng und Barbieri, 2008).

Den gleichen Wirkmechanismus zeigt das Diphtherie-Toxin (DT), welches von *Corynebacterium diphtheriae* produziert wird. DT durchbricht jedoch bereits auf endosomaler Ebene die Membran. Im sauren pH-Bereich der Endosomen kommt es zur Konformationsänderung, wodurch die B-Untereinheit in die Membran eingelagert wird und einen Translokationskanal formt. Die teilweise entfaltete A-Untereinheit wird ins Zytosol entlassen (Lord *et al.*, 1999). DT gehört wie K28 und PEx zu den AB-Toxin-Dimeren, die einen Proteinrezeptor zur Aufnahme in die Zelle nutzen. Der DT-Rezeptor ist das Vorläuferprotein des humanen Wachstumsfaktorrezeptors HB-EGF („heparinbinding EGF-like growth factor“). Für den Endozytoseprozess wurde ein Clathrin-abhängiger Mechanismus vorgeschlagen (Naglich *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1985).

Das Pertussis-Toxin (PT) zeigt wie das Cholera-Toxin, Shiga-Toxine und das von *E. coli* produzierte „heat labile toxin“ LT einen Aufbau aus fünf B-Untereinheiten, welche die Bindung zu N-glykosylierten Membranproteinen vermitteln und einer A-Untereinheit mit ADP-Ribosylierungsaktivität (Witvliet *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1994a und 1994b). PT gehört somit der Klasse von Toxinen an, welche durch Modifikation von G-Proteinen Signaltransduktionseignisse beeinträchtigen. Die B-Untereinheiten erkennen Sialoglykoproteine auf der Zelloberfläche. Pertussis-Toxin wird wie K28 über Clathrin-beschichtete Vesikel aufgenommen und retrograd zum ER transportiert, wo die katalytische S1-Untereinheit ins Zytosol entlassen wird. Der Mechanismus ist im Einzelnen noch unklar, ein KDEL-Signal ist jedoch nicht beteiligt (Kügler *et al.*, 2007; Plaut und Carbonetti, 2008).

Das von *Clostridium tetani* synthetisierte Neurotoxin (TeNT) und die von *C. botulinum*, *butyricum* und *barati* produzierten Botulinum-Toxine (BoNTs) werden aus Vorläufer-Proteinen durch bakterielle oder Wirts-Proteasen zu

Heterodimeren aus einer leichten (LC) und einer schweren Kette (HC) prozessiert. Die LC-Untereinheit stellt die toxische Komponente dar, welche als Protease spezifisch ihr Zielprotein an der zytosolischen Seite der Plasmamembran spaltet. Die resultierende Inhibierung der Neurotransmitter-Freisetzung in den synaptischen Spalt setzt die Regulation der Motoneuronen außer Kraft (Binz und Rummel, 2009). Die Bindung der HC-Untereinheit ist die Voraussetzung für die Toxizität der LC-Untereinheit. Die schwere Kette beider Toxine gewährleistet den Transport des Toxins über die Plasmamembran bis zum Wirkort, dem Zytoplasma. HC selbst besteht aus einer größtenteils  $\alpha$ -helikalen Untereinheit am N-Terminus und einem C-terminalen Sequenzbereich. Für die „belt“-Region des N-Terminus wurde eine Chaperon-Funktion vorgeschlagen, welche die Entfaltung, den Transit und die erneute Faltung von LC erleichtert. Sowohl bei NeNT als auch bei BoNT ist der C-Terminus der HC-Untereinheit für die Bindung an die Zelloberfläche und die Internalisierung des Toxins verantwortlich (Brunger *et al.*, 2007; Lalli *et al.*, 1999). Als Rezeptoren für TeNT sind inzwischen die Polysialo-Ganglioside GT1b, GD1b und GQ1b bekannt. BoNT bindet überwiegend an GT1b und GD1a (Angström *et al.*, 1994; Yowler und Schengrund, 2004).

Im Unterschied zu Cholera-Toxin erfolgt die Interaktion mit der Zellboberfläche bei BoNT nicht einzig mit Gangliosiden, sondern folgt dem dual-Rezeptor-Konzept durch die zusätzliche Bindung an die Membranproteine Synaptotagmin I, II und SV2 (Dong *et al.*, 2003 und 2006). Nach dem aktuellen Modell führt die Bindung von BoNT an den zahlreich vorkommenden Gangliosid-Rezeptoren zu einer Konzentration des Toxins an der Plasmamembran. Die Endozytose von BoNT vollzieht sich über den Recycling-Mechanismus synaptischer Vesikel, der hauptsächlich auf Clathrin-Beschichtung beruht (Maycox *et al.*, 1992). Nach Verschmelzung eines sekretorischen Vesikels gelangen die Protein-Rezeptoren an die Oberfläche und erlauben die Bindung des Toxins mit gesteigerter Affinität. Die Rückführung des synaptischen Vesikels führt zur Endozytose des Rezeptor/Toxin-Komplexes in Recycling-Endosomen. Deren Ansäuerung bewirkt eine Konformationsänderung des Toxins, welches einen Kanal durch

die Membran bildet und seine eigene Translokation initiiert. Für TeNT ist noch kein Protein-Rezeptor identifiziert, so dass der weitere Transportweg in das Zellinnere weniger gut untersucht ist (Binz und Rummel, 2009). Eine Beteiligung von Clathrin, Dynamin und dem Adapter-Komplex AP-2 wurde für TeNT jedoch bereits vorgeschlagen (Deinhardt *et al.*, 2006). Im Zytoplasma angekommen, werden die L-Untereinheiten beider Toxine als Zink-abhängige Endopeptidasen durch die Spaltung von Synaptobrevin-2, SNAP-25 („synaptosome associated protein of 25 kDa“) bzw. Synaptobrevin-1 aktiv. Die neuromuskuläre Wirkung zeigt sich im Fall von TeNT in Form von Muskelspasmen durch den Mangel an inhibitorischen Neurotransmittern, während BoNT die Ausschüttung aktivierender Transmitter verhindert und so die Muskelkontraktion ausbleibt (Schiavo *et al.*, 1992).

Die Aufnahme von Anthrax-Toxin folgt ebenfalls einem koordinierten Ablauf von Membranbindung, Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsereignissen, bevor die Clathrin-abhängige Endozytose initiiert wird (Abrami *et al.*, 2010a). Das Toxin besteht aus drei Untereinheiten, dem Edema-Faktor (EF), einer Calmodulin-abhängigen Adenylatzyklase; dem Lethal-Faktor (LF), einer Zink-abhängigen Metalloprotease und einer dritten Untereinheit, dem Protektiven Antigen (PA). LF spaltet MAP-Kinase-Kinasen und unterbindet damit die MAP-Kinase-Signal-Transduktion. PA vermittelt die Bindung des Toxins an die Zelloberfläche und den Durchtritt von EF und LF ins Zytoplasma (Scobie und Young, 2005). Der hetero-oligomere Komplex PA<sup>7mer</sup>-EF/LF bindet über einen PA-heptameren Ring an die Oberfläche, wird internalisiert und zu Endosomen transportiert. Dort unterläuft der PA-Ringkomplex eine Konformationsänderung, welche zu seiner Membraninsertion und der Bildung einer Pore führt, durch die EF und LF ins Zytoplasma gelangen. Für das Anthrax-Toxin wurden bisher zwei Oberflächenrezeptoren identifiziert. Es handelt sich um ATR/TEM8 („tumor epithelial marker 8“) und CMG2 („capillary morphogenesis gene 2“). Diese beiden Transmembranproteine, zeichnen sich durch eine hohe Sequenzübereinstimmung in den extrazellulären und zytoplasmatischen Domänen aus (Bradley *et al.*, 2001; Scobie *et al.*, 2003). Die Parallele in der Aufnahme von Anthrax- und K28-Toxin

beschränkt sich nicht nur auf die Nutzung eines Protein-Rezeptors, sondern zeigt auch Übereinstimmungen im Ablauf der Internalisierung. Auch Anthrax-Toxin wird in einem Clathrin-abhängigen Mechanismus unter Aktin-Beteiligung endozytiert. Die für K28 postulierte Rezeptor-Phosphorylierung und -Ubiquitinierung wurde für die Anthrax-Toxin-Aufnahme bereits bestätigt und auch eine Beteiligung von Arrestinen konnte gezeigt werden. Somit zeigt das aktuelle Modell der K28-Aufnahme bemerkenswerte Ähnlichkeit zur Endozytose des trimeren Anthrax-Toxin-Komplexes (Abrami *et al.*, 2010 a und b).

Am Beispiel von Pet, dem „plasmid encoded toxin“ enteroaggregativer *E. coli* Stämme, wurde erstmalig ein nicht-AB-Toxin beschrieben, das von der Zelloberfläche zum ER transportiert und vom ER ins Zytosol retrotransloziert wird. Die durch Pet verursachte Schädigung der intestinalen Mucosa setzt nicht nur die Serin-Protease-Funktion des Toxins, sondern auch seine Endozytose voraus, um sein intrazelluläres Ziel, das Aktin-Zytoskelett zu erreichen. Der Aufnahme-Prozess wird durch die Bindung an die Zelloberfläche initiiert, die Internalisierung erfolgt Clathrin-vermittelt und unabhängig von lipid rafts (Navarro-Garcia *et al.*, 2007a). Das Toxin wird innerhalb kurzer Zeit aufgenommen und verhält sich damit analog zu den AB-Toxinen CT, Shiga, Ricin und K28, welche ebenfalls über einen schnellen, Rezeptor-vermittelten Prozess aufgenommen werden. Nur ein geringer Teil des Toxins gelangt in Lysosomen. Pet fehlt ein C-terminales KDEL-Motiv. Der Rückführungsmechanismus verläuft vermutlich ähnlich wie bei Shiga-Toxin oder Ricin über einen COPI-unabhängigen Weg (Navarro-Garcia *et al.*, 2007b; Chen *et al.*, 2003; Girod *et al.*, 1999). Auch für Pet wurde eine ERAD-abhängige ER-Zytosol-Dislokation durch Sec61 vorgeschlagen. Im Unterschied zu den AB-Toxinen CT, Ricin und den Shiga-Toxinen wird jedoch das vollständige Pet-Protein transloziert. Hier unterscheidet sich Pet also von der Translokation von K28, welches kurz nach seinem Zytosol-Eintritt dissoziiert. Pet entfaltet seine toxische Wirkung im Zytosol seiner Zielzelle, indem es durch Spaltung von Fodrin, einem Aktin-bindenden Protein, die Zytoskelett-

Organisation zerstört, was zur Auflösung von Zellverbänden führt (Navarro-Garcia *et al.*, 2007b).

Das viral kodierte Proteintoxin K28 stimmt in der Erkennung seines Membranrezeptors, der Aufnahme über beschichtete Vesikel und dem retrograden Transport bis hin zur ER-Zytosol-Dislokation mit dem Zelleintritt und intrazellulären Weg zahlreicher AB-Toxine überein. Gleichzeitig lassen sich anhand der in dieser Arbeit identifizierten Endozytosemotive des K28-Rezeptors Erd2p Parallelen zur Internalisierung von Rezeptoren und Transportern in *S. cerevisiae* sowie in Säugorzellen aufzeigen. Diese Charakteristika machen den Rezeptor/Toxin-Komplex zu einem idealen Modellsystem zur Untersuchung der von Hefe zu Säugorzellen konservierten Transportprozesse.

**Tabelle 17: Vergleich der K28-Endozytose mit der Aufnahme anderer AB-Toxine.**

Die Tabelle führt den Aufbau, das Angriffsziel, den Zelloberflächenrezeptor und die Clathrin- bzw. KDEL-vermittelten Transportwege innerhalb der Zielzelle für K28 und andere bakterielle sowie pflanzliche AB-Toxine auf.

Toxin Organismus	Aufbau	Ziel	Rezeptor	Endozytose	KDEL- Signal
K28 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AB	Zellzyklus Apoptose	Erd2p	Clathrin Ubiquitin Art-Adapter	HDEL
Cholera-Toxin (CT) <i>Vibrio cholerae</i>	AB <sub>5</sub>	Signaltrans- duktion, Apoptose	Ganglioside	Clathrin, Caveolae, rafts, tubuläre Strukturen	KDEL
„heat labile toxin“ (LT) <i>Escherichia coli</i>	AB <sub>5</sub>	Signaltrans- duktion, Apoptose	Ganglioside	noch unbekannt	RDEL
Shiga-Toxine (STx, SLTx) <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ; <i>Escherichia coli</i>	AB <sub>5</sub>	Translation Apoptose	Glyko- sphingo- lipide	Clathrin oder DRMs	-
Ricin <i>Ricinus communis</i>	AB	Translation	galaktosyl. Glykolipide, - proteine	Clathrin oder Clathrin- unabh.	-
Pseudomonas Exotoxin A (PEx) <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	AB	Translation, Apoptose	Protein- rezeptoren	Clathrin- oder DRMs	REDL
Diphtherie-Toxin (DT) <i>Corynebacterium</i> <i>diphtheriae</i>	AB	Translation	Protein- rezeptor	Clathrin	-
Pertussis-Toxin (PT) <i>Bordetella pertussis</i>	AB <sub>5</sub>	Signaltrans- duktion	Glykoprotein	Clathrin	-
Tetanus- Neurotoxin (TeNT) <i>Clostridium tetani</i>	AB	Signaltrans- duktion	Ganglioside	Clathrin, AP2	-
Botulinum- Neurotoxin (BoNT) <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i>	AB	Signaltrans- duktion	Ganglioside SNAREs	Recycling synapt. Vesikel, Clathrin	-
Anthrax-Toxin <i>Bacillus anthracis</i>	A <sub>2</sub> B	Signaltrans- duktion	Protein- rezeptoren	Clathrin Ubiquitin Arrestine	-

### Ausblick

Die Möglichkeit, Toxine spezifisch in bestimmten Organellen über Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen, ist in Hefe aufgrund der geringen Zellgröße nur sehr eingeschränkt gegeben. Ein weiterer limitierender Faktor ist die vermutlich geringe intrazelluläre Konzentration (Sandvig und van Deurs, 2002). So ist es bisher zwar gelungen, fluoreszenzmarkierte, aktive K28-Toxin-Varianten und Toxin-Untereinheiten an der Zelloberfläche von Hefezellen mikroskopisch nachzuweisen, die Endozytose und der retrograde Transport konnte bislang jedoch noch nicht nachvollzogen werden (Gießelmann, persönliche Mitteilung). Durch Mikroinjektion konnte die Toxizität von K28 auch in Säugerzellen gezeigt werden (Kelkel, 2009). Die Inkubation von K28-Varianten mit KDEL- oder HDEL-Signalen in verschiedenen immortalisierten Zelllinien weist auf eine selektive Aufnahme des HDEL-markierten Toxins durch den humanen ERD23-Rezeptor hin (Klein, 2009). Dieser Rezeptor zeigt im Gegensatz zu den beiden humanen Rezeptoren - dem KDEL-Rezeptor ERD21 und HDEL-Rezeptor ERD22 – eine Präferenz für das HDEL-Motiv (Raykhel *et al.*, 2007). Die apoptotische Wirkung der K28-Variante mit HDEL-Signal konnte in immortalisierten Zelllinien jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der Versuch, Aufnahme und Wirkung fluoreszenzmarkierter K28-Varianten in Säugerzellen zu beobachten, scheiterte an den pH-Bedingungen. Das pH-Optimum für die Toxin-Bindung liegt im sauren Bereich, was sich nicht mit den Kultivierungsbedingungen für Säugerzellen vereinbaren lässt. Mit steigendem pH sinkt die Aktivität von K28, zudem werden fluoreszenzmarkierte Toxinvarianten instabil und bilden unlösliche Aggregate (Spindler, 2004; Gießelmann, persönliche Mitteilung). Weitere Untersuchungen zur Endozytose von K28 bleiben somit auf Hefezellen beschränkt. Kürzliche Studien durch TIRF-Mikroskopie deuten darauf hin, dass fluoreszenzmarkiertes Erd2p in Endozytose-defizienten *end3*-Deletionsstämmen signifikant kürzere Wege zurücklegt als in wildtypischen Hefen. Die Blockade der Endozytose wirkt sich einzig auf das Bewegungsverhalten von Plasmamembranproteinen aus. Die verringerte Erd2p-Vesikel-Mobilität im Zellgrenzbereich von  $\Delta end3$ -Mutanten bestätigt

somit die Lokalisation des Rezeptors in der Plasmamembran und dessen reguläre Aufnahme ins Zellinnere in endozytisch aktiven Hefestämmen (Gießelmann, persönliche Mitteilung). Künftige Untersuchungen bei der Entschlüsselung des Clathrin-abhängigen Endozytosewegs sehen sich vor allem mit der Redundanz zahlreicher Komponenten konfrontiert. Wie auch bei den anderen AB-Toxinen CT, Ricin oder STx könnten alternative Routen und Adaptoren ineinandergreifen. Die Beteiligung des AP-2-Komplexes, für den weder das NPF-Motiv noch die Ubiquitin-Markierung von Erd2p die Erkennung ermöglichen, wirft die Frage nach dem Interaktionsmotiv innerhalb der Erd2p-Sequenz auf. Dem klassischen Tyrosin-basierenden Signal der Form YXXΦ konnte keine Funktion zugewiesen werden. Es muss demnach ein bisher für *S. cerevisiae* noch nicht beschriebener Mechanismus existieren, der die Erd2p-vermittelte K28-Endozytose mit dem AP-2-Komplex verbindet (Carroll *et al.*, 2009). Die Beantwortung der Frage, ob die Lipid-Zusammensetzung der von Erd2p besetzten Plasmamembran-Subdomänen eine Rolle für die Endozytose spielt, stellt eine experimentelle Herausforderung dar. Die Signalwirkung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI<sub>4,5</sub>P) für die Ent1p-vermittelte Endozytose könnte auch bei der K28-Internalisierung eine Rolle spielen. Mss4p besitzt eine Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase-Aktivität, welche von Hefe zu Mensch konserviert ist. Das Enzym setzt PI<sub>4</sub>P zu PI<sub>4,5</sub>P (PIP<sub>2</sub>) um und seine Lokalisation an der Plasmamembran ist essentiell für die Aktin-Organisation (Homma *et al.*, 1998). Als essentielles Gen kann sein Einfluss auf die K28-Aufnahme jedoch nicht in dem bisher angewandten genetischen Screening-System untersucht werden.

Abgesehen von den Details zur Internalisierung des Rezeptor/Toxin-Komplexes ist auch noch nicht vollständig geklärt, auf welche Weise der Komplex dem Abbau in der Vakuole entgeht. Der intrazelluläre Weg muss analog zu anderen AB-Toxinen von endosomalen Kompartimenten zum Golgi-Apparat führen, ohne der klassischen Route internalisierter Rezeptoren und Transporter zum lysosomal/vakuolären Abbau zu folgen. Erste Hinweise lieferte Heiligenstein mit der Bestätigung der K28-Hypersensitivität von Deletionsmutanten mit vakuolären Defekten. Bei gestörtem Transport von

Hydrolasen zur Vakuole sowie einem Eingriff in die pH-Stabilisierung der Vakuole erreicht eine größere Anzahl an Rezeptor/Toxin-Komplexen den Golgi (Heiligenstein, 2008). Mit welcher Effizienz der Toxin-gebundene Rezeptor in wildtypischen Zellen den retrograden Weg zum Golgi statt zur Vakuole folgt, ist noch unklar. Dass eine Verhinderung des Abbaus der toxischen K28- $\alpha$ -Untereinheit nach ER/Zytosol-Dislokation ähnlich wie bei Shiga-Toxinen und Ricin auf einen geringen Lysin-Gehalt zurückzuführen ist, kann bisher nur vermutet werden (Johannes und Römer, 2010; Deeks *et al.*, 2002).

Die Funktion der Kollokalisierung des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran, die von dem viral kodierten Killertoxin K28 parasitiert wird, ist der Ansatzpunkt weiterer Betrachtungen. Obschon die essentielle Bedeutung im Golgi-ER-Transport zur Retention ER-residenter Proteine bekannt ist, muss der Rezeptor-Fraktion an der Zelloberfläche der Hefe eine weitere Bedeutung zukommen. Künftige Studien werden zeigen, ob sich das Retentionssystem in *S. cerevisiae* auf sezernierte Proteine im periplasmatischen Raum ausdehnt oder ein davon mechanistisch verschiedener Prozess die Existenz des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran erfordert.

## V Zusammenfassung

K28, ein viral kodiertes A/B-Toxin von Killerstämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* tötet sensitive Zielzellen durch Inhibierung der DNA-Synthese, Arretierung des Zellzyklus und Induktion der Apoptose. Die Aufnahme erfolgt in einem zweistufigen, rezeptorvermittelten Prozess über die Zellwand und die Plasmamembran. Das Toxin durchläuft den Sekretionsweg retrograd und wird Heterodimer in das Zytosol disloziert. Die  $\alpha$ -Untereinheit entfaltet im Nukleus ihre Toxizität, während die  $\beta$ -Untereinheit ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird. Die Schlüsselrolle im retrograden Transport von K28 nimmt der HDEL-Rezeptor Erd2p ein. Frühere Experimente deuteten auf eine Funktion von Erd2p als Sekundärrezeptor des Toxins auf Ebene der Plasmamembran hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde der HDEL-Rezeptor der Hefe *S. cerevisiae* auf seine zelluläre Lokalisation, Struktur und Funktion untersucht, um den Mechanismus der Erd2p-vermittelten Endozytose von K28 aufzuklären.

Die Lokalisation von Erd2p wurde mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Als zweites Nachweissystem wurde ein nach dem „RAS recruitment“-System modifizierter, wachstumsbasierter Plasmamembran-Lokalisationsreporter zur Anwendung gebracht. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse eine Kollokalisierung von Erd2p in ER- und Golgi-Kompartimenten sowie in der Plasmamembran.

Zur Topologie-Analyse von Erd2p wurde eine *in silico* Vorhersage mit drei *in vivo* Topologie-Reportern kombiniert. Die Fusionsproteine aus verkürzten Erd2p-Varianten mit dem C-terminalen Wachstumsreporter RAS für die zytosolische Orientierung, mit dem Glykosylierungsreporter SUC2AV5 für die luminalen Orientierung und mit dem wechselseitigen, redoxsensitiven Reporter ro2GFP bestätigten eine  $N_{in} - C_{in}$ -Topologie von Erd2p mit sechs Transmembranhelices.

Über Mutagenese wurden Erd2p-Rezeptor-Varianten ohne potentielle Endozytose motive hergestellt. Diese Varianten waren in der Lage, den Verlust der chromosomalen *ERD2*-Kopie funktionell zu komplementieren. Die Deletion des N-terminalen NPF-Signals in Erd2p führte zu einem Sensitivitätsverlust gegen K28 und weist auf eine untergeordnete Funktion in der Endozytose der Erd2p/K28-Komplexe hin.

Aus dem Ersetzen aller vier Lysinreste innerhalb des zytosolischen C-terminalen Lysin-Clusters geht ein funktioneller Erd2p-Rezeptor hervor, der jedoch nicht mehr in der Lage ist, eine endozytotische K28-Aufnahme zu vermitteln. Im Zusammenhang mit der Bestätigung der Erd2p/Rsp5p-Interaktion in der BiFC-Analyse belegen diese Ergebnisse die Notwendigkeit einer signalgebenden Ubiquitinierung von Erd2p für die Endozytose von K28.

Art-Proteine können die Aufgabe von Adaptern zwischen der Ubiquitin-Ligase Rsp5p und ihren Substraten an der Plasmamembran übernehmen. Die verminderte Sensitivität von  $\Delta art2$ ,  $\Delta art8$  und  $\Delta art9$ -Mutanten gegen K28 liefert einen Hinweis, dass die Interaktion von Erd2p und Rsp5p über die redundanten Art-Proteine vermittelt wird.

## V Summary

K28, a viral A/B toxin produced by killer strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, kills sensitive yeast cells by inhibition of DNA-synthesis, cell cycle arrest and induction of apoptosis. Cell entry is performed by a two-step receptor-mediated process across the cell wall and the plasma membrane. After retrograde transport through the secretory pathway the toxin dislocates into the cytosol. The  $\alpha$  subunit enters the nucleus and displays its toxicity whereas the  $\beta$  subunit is ubiquitinated and proteasomally degraded. The key component for the retrograde transport of K28 is the HDEL receptor Erd2p. Previous experiments indicated a function for Erd2p as secondary receptor of the toxin at the level of the plasma membrane.

In this study the *S. cerevisiae* HDEL receptor Erd2p was analyzed in terms of cellular localization, structure and function in order to elucidate the mechanism of the Erd2p conducted endocytic uptake of K28.

The localization of Erd2p was analyzed *in vivo* by means of confocal laser scanning fluorescence microscopy. As a second detection system, a growth based plasma membrane localization reporter modified from the RAS recruitment system was applied. Together the results confirmed a colocalization of Erd2p in ER and Golgi compartments as well as in the plasma membrane.

The topological analysis of Erd2p combined *in silico* prediction and three *in vivo* topology reporters. Fusion proteins of truncated Erd2p variants with the C-terminal growth reporter RAS for cytosolic orientation, the glycosylation reporter SUC2AV5 for luminal orientation and the ambilateral redoxsensitive reporter ro2GFP verified an  $N_{in} - C_{in}$  topology of Erd2p with six transmembrane helices.

Mutational analysis of Erd2p resulted in several receptor variants devoid of potential endocytotic motifs but still capable to complement an otherwise lethal loss of the chromosomal *ERD2* copy. Deletion of the N-terminal NPF signal in Erd2p resulted in a significant decrease in K28 sensitivity indicating a subsidiary function in the endocytosis of Erd2p/K28 complexes.

Substitution of all four lysine residues within the cytosolic C-terminal lysine cluster of Erd2p resulted in a functional ER retention receptor yet unable to conduct the endocytosis of K28. Taken together with the confirmation of the Erd2p/Rsp5p interaction via BiFC, those results demonstrate the necessity of a ubiquitylation process for the Erd2p mediated endocytosis of K28.

Art proteins can carry out the task of adaptors between the ubiquitin ligase Rsp5p and its substrates at the plasma membrane. Due to the fact that deletion mutants for *ART2*, *ART8* or *ART9* turned out to be less sensitive to K28, the interaction of the endocytic toxin receptor Erd2p and Rsp5p is likely to be mediated by redundant Art proteins.

## VI Literaturverzeichnis

- Abrami L., Bischofberger M., Kunz B., Groux R. and van der Goot F.G. (2010b):** Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog.* 6, e1000792.
- Abrami L., Kunz B. and van der Goot F.G. (2010a):** Anthrax toxin triggers the activation of src-like kinases to mediate its own uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1420-4.
- Aguilar R.C., Watson H.A. and Wendland B. (2003):** The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *J. Biol. Chem.* 278, 10737-43.
- Ahmad M. and Bussey H. (1986):** Yeast arginine permease: nucleotide sequence of the *CAN1* gene. *Curr. Genet.* 10, 587-92.
- Al-Aidroos K. and Bussey H. (1978):** Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can. J. Microbiol.* 24, 228-37.
- Almen M.S., Nordström K.J., Fredriksson R. and Schiöth H.B. (2009):** Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol.* 13, 1-14.
- Altmeyer A., Maki R.G., Feldweg A.M., Heike M., Protopopov V.P., Masur S.K. and Srivastava P.K. (1996):** Tumor-specific cell surface expression of the -KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int. J. Cancer* 69, 340-9.
- Alvarez F.J., Douglas L.M. and Konopka J.B. (2007):** Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukaryot. Cell* 6, 755-63.
- Andersson H. and von Heijne G. (1994):** Membrane protein topology: effects of delta mu H+ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J.* 13, 2267-72.
- Angström J., Teneberg S. and Karlsson K.A. (1994):** Delineation and comparison of ganglioside-binding epitopes for the toxins of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Clostridium tetani*: evidence for overlapping epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11859-63.
- Ashida S., Takayuki S., Kazuyoshi K. and Hara S. (1983):** New killer toxin of *Hansenula mrakii*. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2953-55.
- Aubry L., Guetta D. and Klein G. (2009):** The arrestin fold: variations on a theme. *Curr. Genomics* 10, 133-42.
- Baggett J.J., D'Aquino K.E. and Wendland B. (2003):** The Sla2p talin domain plays a role in endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 165, 1661-74.
- Barriere H., Nemes C., Du K. and Lukacs G.L. (2007):** Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol. Biol. Cell* 10, 3952-65.
- Barth H., Aktories K., Popoff M.R. and Stiles B.G. (2004):** Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 373-402.
- Bassermann F., von Klitzing C., Münch S., Bai R.Y., Kawaguchi H., Morris S.W., Peschel C. and Duyster J. (2005):** NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* 122, 45-57.
- Beh C.T. and Rose M.D. (1995):** Two redundant systems maintain levels of resident proteins within the yeast endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9820-3.

- Belgareh-Touze N., Leon S., Erpapazoglou Z., Stawiecka-Mirota M., Urban-Grimal D. and Haguenaer-Tsapis R. (2008):** Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 791-6.
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G. and Brunak S. (2004):** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-95.
- Bénédicti H., Raths S., Crausaz F. and Riezman H. (1994):** The *END3* gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5, 1023-37.
- Berman H.M., Battistuz T., Bhat T.N., Bluhm W.F., Bourne P.E., Burkhardt K., Feng Z., Gilliland G.L. et al. (2002):** The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 899-907.
- Bernsel A. and von Heijne G. (2005):** Improved membrane protein topology prediction by domain assignments. *Protein Sci.* 14, 1723-8.
- Bevan E.A. and Makower, M. (1963):** The physiological basis of the killer-character in yeast. *Proc. Int. Congr. Genet.* XI, 1202-3.
- Binz T. and Rummel A. (2009):** Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J. Neurochem.* 109, 1584-95.
- Birnboim H.C. and Doly J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.
- Blanchard F., Raheer S., Duplomb L., Vusio P., Pitard V., Taupin J.L., Moreau J.F., Hoflack B., Minvielle S., Jacques Y. and Godard A. (1998):** The mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a nanomolar affinity receptor for glycosylated human leukemia inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* 273, 20886-93.
- Blom N., Sicheritz-Pontén T., Gupta R., Gammeltoft S. and Brunak S. (2004):** Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633-49.
- Boguski M.S. and McCormick F. (1993):** Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-54.
- Bolen P.L., Eastman E.M., Cihak P.L. and Hayman G.T. (1994):** Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPacl-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 10, 403-14.
- Boll W., Ohno H., Songyang Z., Rapoport I., Cantley L.C., Bonifacino J.S. and Kirchhausen T. (1996):** Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J.* 15, 5789-95.
- Bonifacino J.S. and Traub L.M. (2003):** Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395-447.
- Bostian K.A., Elliott Q., Bussey H., Burn V., Smith A. and Tipper D.J. (1984):** Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* 36, 741-51.
- Brach T., Soyk S., Müller C., Hinz G., Hell R., Brandizzi F. and Meyer A.J. (2009):** Non-invasive topology analysis of membrane proteins in the secretory pathway. *Plant J.* 57, 534-41.
- Bracha-Drori K., Shichrur K., Katz A., Oliva M., Angelovici R., Yalovsky S. and Ohad N. (2004):** Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40, 419-27.
- Bradley K.A., Mogridge J., Mourez M., Collier R.J. and Young J.A. (2001):** Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414, 225-9.
- Breinig F., Schleinkofer K. and Schmitt M.J. (2004):** Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology* 150, 3209-18.

- Breinig F., Sendzik 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, 3810-5.
- 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.
- Broach J.R. (1991):** RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet.* 7, 28-33.
- Broder Y.C., Katz S. and Aronheim A. (1998):** The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr. Biol.* 8, 1121-4.
- Brodsky F.M., Chen C.Y., Kneuhl C., Towler M.C. and Wakeham D.E. (2001):** Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 517-68.
- Broek D., Toda T., Michaeli T., Levin L., Birchmeier C., Zoller M., Powers S. and Wigler M. (1987):** The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48, 789-99.
- Broome-Smith J.K., Tadayyon M. and Zhang Y. (1990):** Beta-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol. Microbiol.* 4, 1637-44.
- Brunger A.T., Breidenbach M.A., Jin R., Fischer A., Santos J.S. and Montal M. (2007):** Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain. *PLoS Pathog.* 3, 1191-4.
- Cabantous S., Terwilliger T.C. and Waldo G.S. (2005):** Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 23, 102-7.
- Cadwell K. and Coscoy L. (2005):** Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 5731, 127-30.
- Cailliez J.C., Séguy N., Aliouat E.M., Polonelli L., Camus D. and Dei-Cas E. (1994):** The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med. Hypotheses* 43, 167-71.
- Calvin N.M. and Hanawalt P.C. (1988):** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170, 2796-801.
- Carroll S.Y., Stirling P.C., Stimpson H.E., Giesselmann E., Schmitt M.J. and Drubin D.G. (2009):** A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev. Cell* 17, 552-60.
- Cartwright C.P. and Tipper D.J. (1991):** In vivo topological analysis of Ste2, a yeast plasma membrane protein, by using beta-lactamase gene fusions. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2620-8.
- 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 A., AbuJarour R.J. and Draper R.K. (2003):** Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI. *J. Cell Sci.* 116, 3503-10.
- Chen A., Hu T., Mikoryak C. and Draper R.K. (2002):** Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1589, 124-39.
- Chen W.J., Goldstein J.L. and Brown M.S. (1990):** NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 3116-23.
- Chinnapen D.J., Chinnapen H., Saslowsky D. and Lencer W.I. (2007):** Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 129-37.

- Ciechanover A. (2005):** N-terminal ubiquitination. *Methods Mol. Biol.* 301, 255-70.
- Cieplak W. Jr., Messer R.J., Konkel M.E. and Grant C.C. (1995):** Role of a potential endoplasmic reticulum retention sequence (REDEL) and the Golgi complex in the cytotoxic activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol. Microbiol.* 16, 789-800.
- Cooper S., Khatib F., Treuille A., Barbero J., Lee J., Beenen M., Leaver-Fay A., Baker D., Popović Z. and Players F. (2010):** Predicting protein structures with a multiplayer online game. *Nature* 466, 756-60.
- Cormack B.P., Bertram G., Egerton M., Gow N.A., Falkow S. and Brown A.J. (1997):** Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 303-11.
- Cosson P. and Letourneur F. (1994):** Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629-31.
- Cox A.D. and Der C. (1997):** Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochim. Biophys. Acta* 1333, F51-71.
- Cserző M., Eisenhaber F., Eisenhaber B. and Simon I. (2002):** On filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng.* 15, 745-52.
- Cserző M., Wallin E., Simon I., von Heijne G. and Elofsson A. (1997):** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* 10, 673-6.
- Csordás G., Várnai P., Golenár T., Roy S., Purkins G., Schneider T.G., Balla T. and Hajnóczky G. (2010):** Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell* 39, 121-32.
- Dai J., Liu B., Caudill M.M., Zheng H., Qiao Y., Podack E.R. and Li Z. (2003):** Cell surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory. *Cancer Immun.* 28, 1-11.
- Deeks E.D., Cook J.P., Day P.J., Smith D.C., Roberts L.M. and Lord J.M. (2002):** The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry* 41, 3405-13.
- Deinhardt K., Berninghausen O., Willison H.J., Hopkins C.R. and Schiavo G. (2006):** Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J. Cell Biol.* 174, 459-71.
- Deng Q. and Barbieri J.T. (2008):** Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 271-88.
- Deshaies R.J. and Schekman R. (1990):** Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6024-35.
- Dignard D., Whiteway M., Germain D., Tessier D. and Thomas D.Y. (1991):** Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* 227, 127-36.
- Dong M., Richards D.A., Goodnough M.C., Tepp W.H., Johnson E.A. and Chapman E.R. (2003):** Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* 162, 1293-303.
- Dong M., Yeh F., Tepp W.H., Dean C., Johnson E.A., Janz R. and Chapman E.R. (2006):** SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 312, 592-6.
- 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, 6127-45.

- Downward J. (2003):** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11-22.
- Drew D., Sjöstrand D., Nilsson J., Urbig T., Chin C.N., de Gier J.W. and von Heijne G. (2002):** Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2690-5.
- Dunn R. and Hicke L. (2001):** Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 12, 421-35.
- Ecker K., Lorenz A., Wolf F., Ploner C., Böck G., Duncan T., Geley S. and Helmberg A. (2009):** A RAS recruitment screen identifies ZKSCAN4 as a glucocorticoid receptor-interacting protein. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 105-17.
- Edidin M. (2003):** The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257-83.
- 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, 926-40.
- 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, 181-91.
- Elmendorf H.G. and Haldar K. (1993):** Identification and localization of *ERD2* in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi. *EMBO J.* 12, 4763-73.
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M. and Tsurugi K. (1987):** The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol Chem.* 262, 5908-12.
- Ercan E., Momburg F., Engel U., Temmerman K., Nickel W. and Seedorf M. (2009):** A conserved, lipid-mediated sorting mechanism of yeast Ist2 and mammalian STIM proteins to the peripheral ER. *Traffic* 10, 1802-18.
- Esser C., Alberti S. and Höhfeld J. (2004):** Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695, 171-88.
- Fan E., O'Neal C.J., Mitchell D.D., Robien M.A., Zhang Z., Pickens J.C., Tan X.J., Korotkov K., Roach C., Krumm B., Verlinde C.L., Merritt E.A. and Hol W.G. (2004):** Structural biology and structure-based inhibitor design of cholera toxin and heat-labile enterotoxin. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 217-23.
- Fan J.Y., Cui Z.Q., Wei H.P., Zhang Z.P., Zhou Y.F., Wang Y.P. and Zhang X.E. (2008):** Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 47-53
- Fedor-Chaiken M., Deschenes R.J. and Broach J.R. (1990):** SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell* 61, 329-40.
- Feldheim D., Rothblatt J. and Schekman R. (1992):** Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3288-96.
- Fölsch H., Ohno H., Bonifacino J.S., Mellman I. (1999):** A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99, 189-98.
- Franz A., Maass K. and Seedorf M. (2007):** A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of Ist2 from the yeast ER to the plasma membrane. *FEBS Lett.* 581, 401-5.

- Fröhlich F., Moreira K., Aguilar P.S., Hubner N.C., Mann M., Walter P. and Walther T.C. (2009): A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* 185, 1227-42.
- Froshauer S., Green G.N., Boyd D., McGovern K. and Beckwith J. (1988): Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 200, 501-11.
- Gafvelin G. and von Heijne G. (1994): Topological "frustration" in multispinning *E. coli* inner membrane proteins. *Cell* 77, 401-12.
- Gafvelin G., Sakaguchi M., Andersson H. and von Heijne G. (1997): Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 272, 6119-27.
- Gagny B., Wiederkehr A., Dumoulin P., Winsor B., Riezman H. and Haguenaer-Tsapis R. (2000): A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J. Cell Sci.* 113, 3309-19.
- Galcheva-Gargova Z., Theroux S.J. and Davis R.J. (1995): The epidermal growth factor receptor is covalently linked to ubiquitin. *Oncogene* 11, 2649-55.
- Garcia-Higuera I., Taniguchi T., Ganesan S., Meyn M.S., Timmers C., Hejna J., Grompe M. and D'Andrea A.D. (2001): Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* 7, 249-62.
- Gershoni J.M. and Palade G.E. (1983): Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131, 1-15.
- Gießelmann, E. (2007): Analyse der *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Gilstring C.F. and Ljungdahl P.O. (2000): A method for determining the *in vivo* topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. *J. Biol. Chem.* 275, 31488-95.
- Girod A., Storrle B., Simpson J.C., Johannes L., Goud B., Roberts L.M., Lord J.M., Nilsson T. and Pepperkok R. (1999): Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 1, 423-30.
- Godar S., Horejsi V., Weidle U.H., Binder B.R., Hansmann C. and Stockinger H. (1999): M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. *Eur. J. Immunol.* 29, 1004-13.
- Goder V., Junne T. and Spiess M. (2004): Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Mol. Biol. Cell* 15, 1470-8.
- Görlich D., Prehn S., Hartmann E., Kalies K.U. and Rapoport T.A. (1992): A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71, 489-503.
- Grossmann G., Malinsky J., Stahlschmidt W., Loibl M., Weig-Meckl I., Frommer W.B., Opekarová M. and Tanner W. (2008): Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 183, 1075-88.
- Gunde T. and Barberis A. (2005): Yeast growth selection system for detecting activity and inhibition of dimerization-dependent receptor tyrosine kinase. *Biotechniques* 39, 541-9.
- Gunge N., Tamaru A., Ozawa F. and Sakaguchi K. (1981): Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. Bacteriol.* 145, 382-90.
- Hafkemeyer P., Brinkmann U., Gottesman M.M. and Pastan I. (1999): Apoptosis induced by *Pseudomonas* exotoxin: a sensitive and rapid marker for gene delivery *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 10, 923-34.
- Hancock J.F., Magee A.I., Childs J.E. and Marshall C.J. (1989): All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57, 1167-77.

- Hancock J.F., Paterson H. and Marshall C.J. (1990):** A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 133-9.
- Hanes S.D., Burn V.E., Sturley S.L., Tipper D.J. and Bostian K.A. (1986):** Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1675-9.
- Hanson G.T., Aggeler R., Oglesbee D., Cannon M., Capaldi R.A., Tsien R.Y. and Remington S.J. (2004):** Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279, 13044-53.
- Hardwick K.G., Boothroyd J.C., Rudner A.D. and Pelham H.R. (1992):** Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J.* 11, 4187-95.
- Hardwick K.G., Lewis M.J., Semenza J., Dean N. and Pelham H.R. (1990):** *ERD1*, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.* 9, 623-30
- Hartley M.R. and Lord J.M. (2004):** Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1701, 1-14.
- Hauri H.P., Kappeler F., Andersson H. and Appenzeller C. (2000):** ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* 113, 587-96.
- Hazes B. and Read R. (1997):** Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *J. Biochemistry.* 36, 11051-4.
- Heiligenstein S. (2008):** Endozytose, Retrotranslokation und Ubiquitinierung des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Heintel T., Zagorc T. and Schmitt M.J. (2001):** Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 165-72.
- Henderson R. and Unwin P.N. (1975):** Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257, 28-32.
- Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E. and Downing K.H. (1990):** Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213, 899-929.
- Henry K.W., Wyce A., Lo W.S., Duggan L.J., Emre N.C., Kao C.F., Pillus L., Shilatifard A. et al., (2003):** Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* 17, 2648-63
- Hershko A. and Ciechanover A. (1992):** The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807.
- Hershko A. and Ciechanover A. (1998):** The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-79.
- Hewitt E.W., Duncan L., Mufti D., Baker J., Stevenson P.G. and Lehner P.J. (2002):** Ubiquitylation of MHC class I by the K3 viral protein signals internalization and TSG101-dependent degradation. *EMBO J.* 21, 2418-29.
- Hicke L. and Riezman H. (1996):** Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-87.
- Hicke L., Zanolari B., Riezman H. (1998):** Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell Biol.* 141, 349-58.
- Hirokawa T., Boon-Chieng S. and Mitaku S. (1998):** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378-9.

- Hofmann K. and Stoffel W. (1993):** TMBASE - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166. Abstract.
- Homma K., Terui S., Minemura M., Qadota H., Anraku Y., Kanaho Y. and Ohya Y. (1998):** Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 15779-86.
- Hopkins A.L. and Groom C.R. (2002):** The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 727-30.
- Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K. and Pease L.R. (1989):** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 77, 61-8.
- Howard J.P., Hutton J.L., Olson J.M. and Payne G.S. (2002):** Sla1p serves as the targeting signal recognition factor for NPF(1,2)D-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 157, 315-26.
- Huber C., Dias-Santagata D., Glaser A., O'Sullivan J., Brauner R., Wu K., Xu X., Pearce K. et al. (2005):** Identification of mutations in CUL7 in 3-M syndrome. *Nat. Genet.* 37, 1119-24.
- Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C., Carroll A.S., Howson R.W., Weissman J.S. and O'Shea E.K. (2003):** Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-91.
- Hurley J.H., Lee S. and Prag G. (2006):** Ubiquitin-binding domains. *Biochem. J.* 399, 361-72.
- 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, 161-9.
- Hwang C., Sinskey A.J. and Lodish H.F. (1992):** Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-502.
- Ikushima H., Munakata Y., Ishii T., Iwata S., Terashima M., Tanaka H., Schlossman S.F. and Morimoto C. (2000):** Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8439-44.
- Ismail N., Crawshaw S.G., Cross B.C., Haagsma A.C. and High S. (2008):** Specific transmembrane segments are selectively delayed at the ER translocon during opsin biogenesis. *Biochem. J.* 411, 495-506.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983):** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-8.
- Jacinto E. and Lorberg A. (2008):** TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.* 410, 19-37.
- 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, 467-75.
- Johannes L. and Römer W. (2010):** Shiga toxins - from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 105-16.
- Jones D.T., Taylor W.R. and Thornton J.M. (1994):** A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* 33, 3038-49.
- Jüschke C., Ferring D., Jansen R.P. and Seedorf M. (2004):** A novel transport pathway for a yeast plasma membrane protein encoded by a localized mRNA. *Curr. Biol.* 14, 406-11.
- Jüschke C., Wächter A., Schwappach B. and Seedorf M. (2005):** SEC18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 169, 613-22.

- Jungmann J., Rayner J.C. and Munro S. (1999):** The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* 274, 6579-85.
- Kaiser C.A. and Schekman R. (1990):** Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61, 723-33.
- Käll L., Krogh A. and Sonnhammer E.L. (2004):** A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 338, 1027-36.
- Kanayama A., Seth R.B., Sun L., Ea C.K., Hong M., Shaito A., Chiu Y.H., Deng L. and Chen Z.J. (2004):** TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* 15, 535-48.
- Kang J.X., Li Y. and Leaf A. (1997):** Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13671-6.
- Kelkel M. (2009):** Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen  $\alpha$ -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Kelm K.B., Huyer G., Huang J.C. and Michaelis S. (2004):** The internalization of yeast Ste6p follows an ordered series of events involving phosphorylation, ubiquitination, recognition and endocytosis. *Traffic* 5, 165-80.
- Kerppola T.K. (2006):** Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* 1, 1278-86.
- Kerscher O., Felberbaum R. and Hochstrasser M. (2006):** Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 159-80.
- Kieken F., Sharma M., Jovic M., Giridharan S.S., Naslavsky N., Caplan S. and Sorgen P.L. (2010):** Mechanism for the selective interaction of C-terminal Eps15 homology domain proteins with specific Asn-Pro-Phe-containing partners. *J. Biol. Chem.* 285, 8687-94.
- Kim H., Melén K. and von Heijne G. (2003):** Topology models for 37 *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteins based on C-terminal reporter fusions and predictions. *J. Biol. Chem.* 278, 10208-13.
- Kim J.J., Olson L.J. and Dahms N.M. (2009):** Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 534-42.
- Kirkham M., Fujita A., Chadda R., Nixon S.J., Kurzchalia T.V., Sharma D.K., Pagano R.E., Hancock J.F., Mayor S. and Parton R.G. (2005):** Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vesicles. *J. Cell Biol.* 168, 465-76.
- Klein S. (2009):** Untersuchungen zur Wirkung und endozytotischen Aufnahme des A/B-Toxins K28 an Säugerzellen. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Kohno K., Normington K., Sambrook J., Gething M.J. and Mori K. (1993):** The promoter region of the yeast *KAR2* (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 13, 877-90.
- Kolb, J.D. (2008):** Aufklärung der Lokalisation und *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p mit Hilfe von ERD2-HIS4C Topologiereporterfusionsproteinen und Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Kolbusz M.A., Ter Horst R., Slotboom D.J. and Lolkema J.S. (2010):** Orientation of small multidrug resistance transporter subunits in the membrane: correlation with the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 402, 127-38.
- Kölling R. and Hollenberg C.P. (1994):** The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13, 3261-71.

- Koltin Y. and Day P.R. (1975):** Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins. *Appl. Microbiol.* 30, 694-6.
- Kozik P., Francis R.W., Seaman M.N. and Robinson M.S. (2010):** A screen for endocytic motifs. *Traffic* 11, 843-55.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. and Sonnhammer E.L. (2001):** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567-80.
- Krsmanovic T., Pawelec A., Sydor T. and Kölling R. (2005):** Control of Ste6 recycling by ubiquitination in the early endocytic pathway in yeast. *Mol. Biol. Cell* 16, 2809-21.
- Kügler S., Böcker K., Heusipp G., Greune L., Kim K.S. and Schmidt M.A. (2007):** Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell. Microbiol.* 9, 619-32.
- Kyte J. and Doolittle R.F. (1982):** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-32.
- Lalli G., Herreros J., Osborne S.L., Montecucco C., Rossetto O. and Schiavo G. (1999):** Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell Sci.* 112, 2715-24.
- LaMantia M., Miura T., Tachikawa H., Kaplan H.A., Lennarz W.J. and Mizunaga T. (1991):** Glycosylation site binding protein and protein disulfide isomerase are identical and essential for cell viability in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4453-7.
- Lauwers E., Erpapazoglou Z., Haguenaer-Tsapis R. and André B. (2010):** The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* 20, 196-204.
- Lee H.I., Gal S., Newman T.C. and Raikhel N.V. (1993):** The *Arabidopsis* endoplasmic reticulum retention receptor functions in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11433-7.
- Lee S.J. and Nathans D. (1988):** Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 263, 3521-7.
- Lee S.Y., Lee M.S., Cherla R.P. and Tesh V.L. (2008):** Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell. Microbiol.* 10, 770-80.
- Lehle L., Strahl S. and Tanner W. (2006):** Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* 45, 6802-18.
- Lencer W.I., Constable C., Moe S., Jobling M.G., Webb H.M., Ruston S., Madara J.L., Hirst T.R. and Holmes R.K. (1995):** Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J. Cell Biol.* 131, 951-62.
- Lenk U. and Sommer T. (2000):** Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *J. Biol. Chem.* 275, 39403-10.
- Leon S. and Haguenaer-Tsapis R. (2009):** Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 1574-83.
- Letourneur F., Gaynor E.C., Hennecke S., Démollière C., Duden R., Emr S.D., Riezman H. and Cosson P. (1994):** Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79, 1199-207.
- Levin D.E., Fields F.O., Kunisawa R., Bishop J.M. and Thorner J. (1990):** A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213-24.

- Levine T. und Loewen C. (2006):** Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 371-8.
- Levkowitz G., Waterman H., Ettenberg S.A., Katz M., Tsygankov A.Y., Alroy I., Lavi S., Iwai K., et al. (1999):** Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 4, 1029-40.
- Lewis M.J. and Pelham H.R. (1992)a:** Sequence of a second human KDEL receptor. *J. Mol. Biol.* 226, 913-6.
- Lewis M.J. and Pelham H.R. (1992)b:** Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-64.
- Lewis M.J., Pelham H.R. (1990):** A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-3.
- 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.
- Li S., Spooner R.A., Allen S.C., Guise C.P., Ladds G., Schnöder T., Schmitt M.J., Lord J.M. and Roberts L.M. (2010):** Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 21, 2543-54.
- Lichtenberg D., Goni F.M. and Heerklotz H. (2005):** Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* 30, 430-6.
- Lin C.F., Chen C.L., Huang W.C., Cheng Y.L., Hsieh C.Y., Wang C.Y. and Hong M.Y. (2010):** Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins* 2, 2158-2176
- Liu M. and Gelli A. (2008):** Elongation factor 3, EF3, associates with the calcium channel Cch1 and targets Cch1 to the plasma membrane in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 7, 1118-26.
- Lord J.M. and Roberts L.M. (1998):** Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 140, 733-6.
- Lord J.M., Deeks E., Marsden C.J., Moore K., Pateman C., Smith D.C., Spooner R.A., Watson P. and Roberts L.M. (2003):** Retrograde transport of toxins across the endoplasmic reticulum membrane. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1260-2.
- Lord J.M., Smith D.C. and Roberts L.M. (1999):** Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 1, 85-91.
- Luo G., Gruhler A., Liu Y., Jensen O.N. and Dickson R.C. (2008):** The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J. Biol. Chem.* 283, 10433-44.
- MacDonald R.G., Pfeffer S.R., Coussens L., Tepper M.A., Brocklebank C.M., Mole J.E., Anderson J.K., Chen E., Czech M.P. and Ullrich A. (1988):** A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* 239, 1134-7.
- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D. and Polonelli L. (1997):** Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 369-400.
- Maier O., Oberle V. and Hoekstra D. (2002):** Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids* 116, 3-18.
- Majoul I., Sohn K., Wieland F.T., Pepperkok R., Pizza M., Hillemann J. and Söling H.D. (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, 601-12.
- Majoul I.V., Bastiaens P.I. 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, 777-89.

- Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L. and Plummer T.H. Jr. (1989):** Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 180, 195-204.
- Malínská K., Malínský J., Opekarová M. and Tanner W. (2003):** Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4427-36.
- Malinsky J., Opekarová M. and Tanner W. (2010):** The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast* 27, 473-8.
- Manoil C. and Beckwith J. (1986):** A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 233, 1403-8.
- Marquina D., Santos A. and Peinado J.M. (2002):** Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5, 65-71.
- Martinac B., Zhu H., Kubalski A., Zhou X.L., Culbertson M., Bussey H. and Kung C. (1990):** Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6228-32.
- Martinez-Menárguez J.A., Prekeris R., Oorschot V.M., Scheller R., Slot J.W., Geuze H.J. and Klumperman J. (2001):** Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 155, 1213-24.
- Maycox P.R., Link E., Retz A., Morris S.A. and Jahn R. (1992):** Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* 118, 1379-88.
- McIlvaine T. C. (1921):** A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183-186.
- 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.
- Miesenböck G. and Rothman J.E. (1995):** The capacity to retrieve escaped ER proteins extends to the trans-most cisterna of the Golgi stack. *J. Cell Biol.* 129, 309-19.
- Miller J.P., Lo R.S., Ben-Hur A., Desmarais C., Stagljar I., Noble W.S. and Fields S. (2005):** Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12123-8.
- Mintzer K.A. and Field J. (1999):** The SH3 domain of the *S. cerevisiae* Cdc25p binds adenylyl cyclase and facilitates Ras regulation of cAMP signalling. *Cell Signal.* 11, 127-35.
- Miranda M. and Sorkin A. (2007):** Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol. Interv.* 7, 157-67.
- Mittal R., McMahon H.T. (2009):** Arrestins as adaptors for ubiquitination in endocytosis and sorting. *EMBO Rep.* 10, 41-3.
- Monné M., Gafvelin G., Nilsson R. and von Heijne G. (1999):** N-tail translocation in a eukaryotic polytopic membrane protein: synergy between neighboring transmembrane segments. *Eur. J. Biochem.* 263, 264-9.
- Montesano R., Roth J., Robert A. and Orci L. (1982):** Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296, 651-3.
- Mori K., Sant A., Kohno K., Normington K., Gething M.J. and Sambrook J.F. (1992):** A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J.* 11, 2583-93.

- Mori S., Heldin C.H. and Claesson-Welsh L. (1993):** Ligand-induced ubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor plays a negative regulatory role in its mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* 268, 577-83.
- Morris R.E., Gerstein A.S., Bonventre P.F. and Saelinger C.B. (1985):** Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infect. Immun.* 50, 721-7.
- Moya M., Dautry-Varsat A., Goud B., Louvard D. and Boquet P. (1985):** Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. *J. Cell Biol.* 101, 548-59.
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Müller E., Meier T., Wilmanns W. and Issels R.D. (1995):** A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J. Cancer* 61, 272-9.
- Munro S. and Pelham H. R. (1987):** A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907
- Muratani M. and Tansey W.P. (2003):** How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 192-201.
- Naglich J.G., Metherall J.E., Russell D.W. and Eidels L. (1992):** Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-61.
- Navarro-García F., Canizalez-Roman A., Burlingame K.E., Teter K. and Vidal J.E. (2007b):** Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. *Infect. Immun.* 75, 2101-9.
- Navarro-García F., Canizalez-Roman A., Vidal J.E. and Salazar M.I. (2007a):** Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology* 153, 2828-38.
- Nickel W. and Seedorf M. (2008):** Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 287-308.
- Nikko E., Sullivan J.A. and Pelham H.R. (2008):** Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9, 1216-21.
- Novotná D., Flegelová H. and Janderová B. (2004):** Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4, 803-813
- Orlean P. (1990):** Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5796-805.
- Ou Y.Y., Chen S.A. and Gromiha M.M. (2010):** Prediction of membrane spanning segments and topology in beta-barrel membrane proteins at better accuracy. *J. Comput. Chem.* 31, 217-23.
- Ozawa T. (2009):** Protein reconstitution methods for visualizing biomolecular function in living cells. *Yakugaku Zasshi* 129, 289-95.
- Palmer E. and Freeman T. (2004):** Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comp. Funct. Genomics* 5, 342-53.
- Pan X., Roberts P., Chen Y., Kvam E., Shulga N., Huang K., Lemmon S. and Goldfarb D.S. (2000):** Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol. Biol. Cell* 11, 2445-57.

- Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J., Bhalgat M.K., Millard P.J., Mao F., Leung W.Y. and Haugland R.P. (1999):** Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1179-88.
- Paoluzi S., Castagnoli L., Lauro I., Salcini A.E., Coda L., Fre S., Confalonieri S., Pelicci P.G., Di Fiore P.P. and Cesareni G. (1998):** Recognition specificity of individual EH domains of mammals and yeast. *EMBO J.* 17, 6541-50.
- Park C.M., Berry J.O. and Bruenn J.A. (1996):** High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30, 359-66.
- Park T., Struck D.K., Deaton J.F. and Young R. (2006):** Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19713-8.
- Parton R.G. (1994):** Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 155-66.
- Pelham H. R., Hardwick K.G. and Lewis M.J. (1988):** Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J.* 7, 1757-62.
- Pelham H.R. (1988):** Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* 7, 913-8.
- Pelham H.R. (2001):** Traffic through the Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 155, 1099-101.
- Perry R.J. and Ridgway N.D. (2006):** Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol. Biol. Cell* 17, 2604-16.
- Petitjean A., Hilger F. and Tatchell K. (1990):** Comparison of thermosensitive alleles of the *CDC25* gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124, 797-806.
- Pfluger S.L., Goodson H.V., Moran J.M., Ruggiero C.J., Ye X., Emmons K.M. and Hager K.M. (2005):** Receptor for retrograde transport in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 4, 432-42.
- Pidoux A.L. and Armstrong J. (1992):** Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 11, 1583-91.
- 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, 4540-8.
- Pitonzo D. and Skach W.R. (2006):** Molecular mechanisms of aquaporin biogenesis by the endoplasmic reticulum Sec61 translocon. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 976-88.
- Plaut R.D. and Carbonetti N.H. (2008):** Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell. *Cell. Microbiol.* 10, 1130-9.
- Plempner R.K., Böhmler 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, 891-5.
- Polo S., Confalonieri S., Salcini A.E. and Di Fiore P.P. (2003):** EH and UIM: endocytosis and more. *Sci. STKE.* 213, 1-17.
- Polo S., Sigismund S., Faretta M., Guidi M., Capua M.R., Bossi G., Chen H., De Camilli P. and Di Fiore P.P. (2002):** A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-5.
- Posaric, I. (2008):** Etablierung des split-EGFP-Systems in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Analyse von Protein/Protein-Wechselwirkungen. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Psakis G., Nitschkowski S., Holz C., Kress D., Maestre-Reyna M., Polaczek J., Illing G. and Essen L.O. (2007):** Expression screening of integral membrane proteins from *Helicobacter pylori* 26695. *Protein Sci.* 16, 2667-76.

- Purchio A.F., Cooper J.A., Brunner A.M., Lioubin M.N., Gentry L.E., Kovacina K.S., Roth R.A. and Marquardt H. (1988):** Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor. *J. Biol. Chem.* 263, 14211-5.
- Radler F., Herzberger S., Schönig I. and Schwarz P. (1993):** Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 495-500.
- Rapoport I., Chen Y.C., Cupers P., Shoelson S.E. and Kirchhausen T. (1998):** Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 17, 2148-55.
- Raths S., Rohrer J., Crausaz F. and Riezman H. (1993):** end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 120, 55-65.
- Raykhel I., Alanen H., Salo K., Jurvansuu J., Nguyen V.D., Latva-Ranta M. and Ruddock L. (2007):** A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J. Cell Biol.* 179, 1193-204.
- 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, 353-8.
- Rexach M.F. and Schekman R.W. (1991):** Distinct biochemical requirements for the budding, targeting, and fusion of ER-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* 114, 219-29.
- Ries C. (2004):** Untersuchungen zur Plasmamembran-Lokalisierung des HDEL-Rezeptors Erd2p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Riffer F., Einfeld K., Breinig F. and Schmitt M.J. (2002):** Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 148, 1317-28.
- Römer W., Berland L., Chambon V., Gaus K., Windschiegl B., Tenza D., Aly M.R., Fraissier V., et al. (2007):** Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450, 670-5.
- Rotblat B., Ehrlich M., Haklai R. and Kloog Y. (2008):** The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (Salirasib) disrupts the spatiotemporal localization of active Ras: a potential treatment for cancer. *Methods Enzymol.* 439, 467-89.
- Roth A.F. and Davis N.G. (2000):** Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 8143-53.
- Rothblatt J.A., Deshaies R.J., Sanders S.L., Daum G. and Schekman R. (1989):** Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 109, 2641-52.
- Salcini A.E., Confalonieri S., Doria M., Santolini E., Tassi E., Minenkova O., Cesareni G., Pelicci P.G. and Di Fiore P.P. (1997):** Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes Dev.* 11, 2239-49.
- 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)
- Sandvig K. and van Deurs B. (2002):** Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 1-24.

- Sandvig K., Ryd M., Garred O., Schweda E., Holm P.K. and van Deurs B. (1994):** Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J. Cell Biol.* 126, 53-64.
- Sandvig K., Torgersen M.L., Engedal N., Skotland T. and Iversen T.G. (2010):** Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett.* 584, 2626-34.
- Sato K., Sato M. and Nakano A. (1997):** Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9693-8.
- Saxena S.K., O'Brien A.D. and Ackerman E.J. (1989):** Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 596-601.
- Scarborough G.A. (2000):** The plasma membrane proton-translocating ATPase. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 871-83.
- Schägger H. and von Jagow G. (1987):** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-79.
- Schäuble N. (2008):** Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zur Identifizierung von *in vivo* Interaktionspartnern des viralen K28 Toxins in Hefe. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Scheffner M. and Staub O. (2007):** HECT E3s and human disease. *BMC Biochem.* 22, 1-16.
- Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Polverino de Laureto P., DasGupta B.R. and Montecucco C. (1992):** Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832-5.
- Schmitt M. 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, 3347-54.
- Schmitt M. and Radler F. (1988):** Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 2192-6.
- Schmitt M.J. (1995):** Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 246, 236-46.
- Schmitt M.J. and Breinig F. (2002):** The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 257-76.
- 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 Reiter J. (2008):** Viral induced yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783, 1413-7.
- Schmitt M.J. and Tipper D.J. (1990):** K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4807-15.
- Schmitt M.J. and Tipper D.J. (1995):** Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology* 213, 341-51.
- Schmitt M.J., Breinig F. (2006):** Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 212-21.
- Schmitt M.J., Klavehn P., Wang J., Schöning I., Tipper D.J. (1996):** Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology* 142, 2655-62.
- Schmitt M.J., Poravou O., Trenz K., Rehfeldt K. (1997):** Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-Candida activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 71, 8852-5.

- Schmitz A., Herrgen H., Winkeler A. and Herzog V. (2000):** Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell Biol.* 148, 1203-12.
- Schorr S. (2009):** Nachweis der *in vivo* Funktionalität verschiedener mCherry-Protein-Fusionen und Identifizierung zellulärer Interaktionspartner des viralen Hefe-Toxins K28 mittels BiFC. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Schuldiner M., Collins S.R., Thompson N.J., Denic V., Bhamidipati A., Punna T., Ihmels J., Andrews B., et al. (2005):** Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507-19.
- Schulz G.E. (2000):** beta-Barrel membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 443-7.
- Scobie H.M. and Young J.A. (2005):** Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 106-12.
- Scobie H.M., Rainey G.J., Bradley K.A. and Young J.A. (2003):** Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 5170-4.
- Seetharam S., Chaudhary V.K., FitzGerald D. and Pastan I. (1991):** Increased cytotoxic activity of *Pseudomonas* exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. *J. Biol. Chem.* 266, 17376-81.
- Semenza J.C., Hardwick K.G., Dean N. and Pelham H.R. (1990):** *ERD2*, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61, 1349-57.
- Sengstag C., Stirling C., Schekman R. and Rine J. (1990):** Genetic and biochemical evaluation of 222cacia222tic membrane protein topology: multiple transmembrane domains of *Saccharomyces cerevisiae* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol. Cell. Biol.* 10, 672-80.
- Seppä L. and Makarow M. (2005):** Regulation and recovery of functions of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone BiP/Kar2p after thermal insult. *Eukaryot. Cell* 4, 2008-16.
- Serrano R. (1978):** Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 22, 51-63.
- Seufert W. and Jentsch S. (1990):** Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9, 543-50.
- Sevrieva, I. (2009):** Colocalisation studies of the cellular HDEL-receptor Erd2p in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Master Thesis*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken; Hochschule Mannheim
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E. and Tsien R.Y. (2004):** Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-72.
- Shaner N.C., Steinbach P.A. and Tsien R.Y. (2005):** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* 2, 905-9.
- 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, 815-20.
- Shimomura O., Johnson F.H. and Saiga Y. (1962):** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59, 223-39.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K. et al., (2000):** Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302-5.

- Singh P., Tang B.L., Wong S.H. and Hong W. (1993):** Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6435-41.
- Skach W.R. (2009):** Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 606-12.
- Smith D.C., Spooner R.A., Watson P.D., Murray J.L., Hodge T.W., Amessou M., Johannes L., Lord J.M. and Roberts L.M. (2006):** Internalized *Pseudomonas* exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum. *Traffic* 7, 379-93.
- Sonnhammer E.L., von Heijne G. and Krogh A. (1998):** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6, 175-82.
- Sorkin A. and von Zastrow M. (2002):** Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 600-14.
- Spindler J. (2004):** Untersuchungen zur endocytotischen Aufnahme und intrazellulären Expression von K28-Toxinderivaten in Hefe- und Säugerzellen, *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Spooner R.A., Smith D.C., Easton A.J., Roberts L.M. and Lord J.M. (2006):** Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Viol. J.* 7, 3:26.
- Stark M.J., Boyd A., Mileham A.J. and Romanos M.A. (1990):** The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast* 6, 1-29.
- 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, 783-96.
- Stein P.E., Boodhoo A., Armstrong G.D., Cockle S.A., Klein M.H. and Read R.J. (1994a):** The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2, 45-57.
- Stein P.E., Boodhoo A., Armstrong G.D., Heerze L.D., Cockle S.A., Klein M.H. and Read R.J. (1994b):** Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding. *Nat. Struct. Biol.* 1, 591-6.
- Steyer J.A. and Almers W. (2001):** A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 268-75.
- 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, 3381-9.
- Surade S., Klein M., Stolt-Bergner P.C., Muenke C., Roy A. and Michel H. (2006):** Comparative analysis and "expression space" coverage of the production of prokaryotic membrane proteins for structural genomics. *Protein Sci.* 15, 2178-89.
- Swanson K.A., Kang R.S., Stamenova S.D., Hicke L. and Radhakrishnan I. (2003):** Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J.* 22, 4597-606.
- Tamayo E., Postigo J., Del Giudice G., Rappuoli R., Benito A., Yagita H., Merino R. and Merino J. (2009):** Involvement of the intrinsic and extrinsic cell-death pathways in the induction of apoptosis of mature lymphocytes by the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Eur. J. Immunol.* 39, 439-46.
- Tan S., Tan H.T. and Chung M.C. (2008):** Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 8, 3924-32.
- Tang B.L., Wong S.H., Qi X.L., Low S.H. and Hong W. (1993):** Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J. Cell Biol.* 120, 325-38.

- Tang H.Y., Xu J. and Cai M. (2000):** Pan1p, End3p, and S1a1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 20, 12-25.
- Theisen S., Molkenau E. and Schmitt, M. J. (2000):** Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Williopsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 547–550.
- Tipper D.J. and 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, 2331-8.
- Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M. and Wigler M. (1987):** Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-87.
- Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S., Broach J. et al. (1985):** In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- Toret C.P. and Drubin D.G. (2006):** The budding yeast endocytic pathway. *J. Cell Sci.* 119, 4585-7.
- Torgersen M.L., Skretting G., van Deurs B. and Sandvig K. (2001):** Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell Sci.* 114, 3737-47.
- Townsley F.M., Frigerio G. and Pelham H.R. (1994):** Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J. Cell Biol.* 127, 21-8.
- Townsley F.M., Wilson D.W. and Pelham H.R. (1993):** Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* 12, 2821-9.
- Tusnády G.E. and Simon I. (1998):** Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283, 489-506.
- Tusnády G.E. and Simon I. (2001):** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.* 17, 849-50.
- Vagnoli P., Musmanno R.A., Cresti S., Di Maggio T. and Coratza G. (1993):** Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the tuscan region of italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4037-4043.
- van Deurs B., Pedersen L.R., Sundan A., Olsnes S. and Sandvig K. (1985):** Receptor-mediated endocytosis of a ricin-colloidal gold conjugate in vero cells. Intracellular routing to vacuolar and tubulo-vesicular portions of the endosomal system. *Exp. Cell Res.* 159, 287-304.
- Viklund H. and Elofsson A. (2004):** Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein Sci.* 13, 1908-17.
- Vitale A., Ceriotti A. and Denecke J. (1993):** The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J. Exp. Bot.* 44, 1417-1444.
- von Heijne G. (1992):** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225, 487-94.
- von Heijne G. (1995):** Membrane protein assembly: rules of the game. *Bioessays.* 17, 25-30.
- von Heijne G. (1999):** A day in the life of Dr K. or how I learned to stop worrying and love lysozyme: a tragedy in six acts. *J. Mol. Biol.* 293, 367-79.
- von Heijne G. (2006):** Membrane-protein topology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 909-18.

- Wälchli S., Aasheim H.C., Skanland S.S., Spilsberg B., Torgersen M.L., Rosendal K.R. and Sandvig K. (2009):** Characterization of clathrin and Syk interaction upon Shiga toxin binding. *Cell Signal.* 21, 1161-8.
- Wales R., Roberts L.M. and Lord J.M. (1993):** Addition of an endoplasmic reticulum retrieval sequence to ricin A chain significantly increases its cytotoxicity to mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 268, 23986-90.
- Wallin E. and von Heijne G. (1998):** Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029-38.
- Walther T.C., Brickner J.H., Aguilar P.S., Bernales S., Pantoja C. and Walter P. (2006):** Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998-1003.
- Weiler F. and Schmitt M.J. (2003):** Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* 3, 69-76.
- Weiss M. and Nilsson T. (2000):** Protein sorting in the Golgi apparatus: a consequence of maturation and triggered sorting. *FEBS Lett.* 486, 2-9.
- Wendland B., Steece K.E. and Emr S.D. (1999):** Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *EMBO J.* 18, 4383-93.
- Wesche J., Rapak A. and Olsnes S. (1999):** Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 274, 34443-9.
- Wickner R.B. (1996):** Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 60, 250-65.
- Wiest D.L., Bhandoola A., Punt J., Kreibich G., McKean D. and Singer A. (1997):** Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1884-9.
- Wiest D.L., Burgess W.H., McKean D., Kearse K.P. and Singer A. (1995):** The molecular chaperone calnexin is expressed on the surface of immature thymocytes in association with clonotype-independent CD3 complexes. *EMBO J.* 14, 3425-33.
- Wilkinson B.M., Critchley A.J. and Stirling C.J. (1996):** Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J. Biol. Chem.* 271, 25590-7.
- Wilson D.W., Lewis M.J. and Pelham H.R. (1993):** pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 7465-8.
- Witvliet M.H., Burns D.L., Brennan M.J., Poolman J.T. and Manclark C.R. (1989):** Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. *Infect. Immun.* 57, 3324-30.
- Wood R.J. and Hulett M.D. (2008):** Cell surface-expressed cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CD222) binds enzymatically active heparanase independently of mannose 6-phosphate to promote extracellular matrix degradation. *J. Biol. Chem.* 283, 4165-76.
- Wu M.M., Buchanan J., Luik R.M. and Lewis R.S. (2006):** Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 174, 803-13.
- Xia J.X., Ikeda M. and Shimizu T. (2004):** ConPred\_elite: a highly reliable approach to transmembrane topology predication. *Comput. Biol. Chem.* 28, 51-60.
- Xiao G., Chung T.F., Pyun H.Y., Fine R.E. and Johnson R.J. (1999):** KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 72, 121-8.

- Yokomori Y., Akyiama H. and Shimizu K. (1988):** Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2791-96.
- Young M.E., Karpova T.S., Brügger B., Moschenross D.M., Wang G.K., Schneiter R., Wieland F.T. and Cooper J.A. (2002):** The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol. Cell Biol.* 22, 927-34.
- Yowler B.C. and Schengrund C.L. (2004):** Botulinum neurotoxin A changes conformation upon binding to ganglioside GT1b. *Biochemistry* 43, 9725-31.
- Zacharias D.A., Violin J.D., Newton A.C. and Tsien R.Y. (2002):** Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-6.
- Zhang X., Lester R.L. and Dickson R.C. (2004):** Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* 279, 22030-8.
- 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, 251-66.

**Internet:** [bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)  
[www.enzim.hu/hmmtop](http://www.enzim.hu/hmmtop)  
[www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)  
[www.sbc.su.se/~miklos/DAS/](http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/)  
[mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html)  
[www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)  
[phobius.sbc.su.se/](http://phobius.sbc.su.se/)  
[saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html](http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html)  
[mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred](http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred)  
[www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)  
[www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, Dezember 2010

(Julia Dausend)

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt meinen Dank für die Überlassung dieses interessanten und herausfordernden Themas aussprechen. Sein stetes Interesse am Fortschritt meiner Experimente und die Offenheit für neue Ideen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ein ganz besonderes Dankeschön für Ihre stete Hilfsbereitschaft in allen Fragen, mit denen ich vor, während und auch nach meiner Doktorarbeit bei Ihnen immer eine offene Tür fand.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Helms ganz herzlich für die Übernahme des Koreferats, insbesondere für die Bereitschaft, sich mit den rein biologischen Details auseinanderzusetzen.

Für die freundliche Bereitstellung der Plasmide pro2GFP und pAF18 bedanke ich mich bei Professor J. Remington vom Institute of Molecular Biology, und PD Dr. Matthias Seedorf vom Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg. Ein herzlicher Dank für die stets freundliche Betreuung am CLSM mit viel Interesse an der Fragestellung geht an die Pharmazeutische Fakultät der Universität des Saarlandes, an Juniorprofessor Dr. Marc Schneider und Leon Muijs. Für die ersten Aufnahmen, die gezeigt haben, dass sich die konfokale Mikroskopie an Erd2p durchaus lohnt, ein ganz liebes Dankeschön an Dr. Nora Luniak.

Vielen Dank an meine ehemaligen Studenten Esther Gießelmann, Anna Jantke, Ivanka Sevrieva, Stefan Schorr und Dieter Kolb, die während ihres F-Praktikums, ihrer Master- oder Diplomarbeit mit viel Interesse und Durchhaltevermögen zahlreiche Vorarbeiten geleistet haben. Speziell die Extraportion an Spaß und Witz aus dem Diplomandenlabor hat regelmäßig für eine frische Stimmung gesorgt.

Der gesamten Labormannschaft, insbesondere Esther Gießelmann, meiner „Mitstreiterin an der Erd2p-Front“, danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und bei der Betreuung von Studenten, die gegenseitige Unterstützung sowie selbstverständlich für die kulinarischen Highlights in Form von Brunch, Kuchen- oder sogar Torten-Pausen. Allen jetzigen Doktoranden wünsche ich noch viel Erfolg und weiterhin gute Laune im Labor. Ganz sicher werde ich mich noch lange an die einmalige Atmosphäre in der Arbeitsgruppe erinnern. Nicole Jundel danke ich für ihre geduldige Unterstützung bei allen Fax-, Formular- und Verwaltungsfragen und natürlich auch für den kleinen Flurplausch zwischendurch.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Frank Breinig für die Unterstützung beim Einstieg in die Thematik und die zündende Idee zum RAS-System. Ich danke Dir für viele Anregungen, aber auch für Deine entspannte, witzige Art. In der Tat hat der Großteil Deiner Scherze die Laborroutine sehr amüsant aufgelockert.

An dieser Stelle auch meinen herzlichen Dank an Roswitha Schepp - für Kollegialität und Hilfsbereitschaft, die weit über das Selbstverständliche hinausgehen. Mit Herzlichkeit und Humor hast Du bei unserem regen Gedankenaustausch über mehr als nur den Laboralltag dafür gesorgt, dass ich nicht im Schreibräumchen vereinsamt bin und hast mir viele Denkanstöße gegeben.

Dr. Tanja Sendzig, Dr. Diane Drescher-Petersen, Mark Lind und Dr. Frank Powilleit sowie allen anderen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zellbiologie möchte ich noch einmal meine Grüße und guten Wünsche aussprechen. Leider verliert sich nach einem Labor- und Ortswechsel häufig der Kontakt. Ich werde aber nicht vergessen, dass es mit euch immer Spaß gemacht hat, Neues zu lernen, Protokolle auszutauschen und sich gemeinsam an den Ergebnissen zu freuen.

Besonders Meike Gratz und Barbara Walch danke ich für die schöne Zeit sowohl innerhalb als auch außerhalb des Mädelslabors und die vielen gemeinsamen Unternehmungen, die uns diese Zeit versüßt haben.

Mareike Kelkel und Tina Schnöder danke ich ganz herzlich dafür, auch über die gemeinsame Laborzeit hinaus trotz aller Anforderungen des Berufslebens an einer tollen Freundschaft festgehalten zu haben. Ich danke euch für die vielen fruchtbaren Gespräche im Labor, vor allem aber für die zahlreichen Unternehmungen außerhalb des Campus. Auch wenn's mal wieder etwas länger dauert, bis man sich wieder sieht, kann ich mich immer darauf verlassen, dass ich bei euch auf offene Ohren und ehrliche Meinungen stoße.

Neben Unterstützung bei labortechnischen Fragen braucht man zeitweilig während einer Doktorarbeit die fachliche Kompetenz von Spezialisten für kleine Software-Probleme und für Entspannung. Ein großes Dankeschön daher an Benjafan, das Informatiker-Duo, deren Assistenz bei Entspannung und Blödelei an den Freitagabenden unverzichtbar war und bleibt.

Herzlichen Dank auch an meinen Stefan. Deine Anregungen haben diese Arbeit von kritischen Fragen am Anfang bis zur Korrektur am Ende begleitet. Ich freue mich darauf, auch in Zukunft gemeinsam mit Dir neue Problemstellungen anzugehen und Lösungsstrategien zu finden.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die in allen Lebenslagen für mich da ist. Besonders in den letzten Monaten dieser Arbeit waren meine Eltern mir eine Stütze, auf die ich mich immer verlassen konnte. Meiner Schwester Anne danke ich dafür, dass sie mir gezeigt hat, wie sehr es sich lohnen kann, mit einer guten Portion Mut vom eingeschlagenen Weg abzuweichen und etwas Neues zu wagen.

## Lebenslauf

Name: **Julia Maria Dausend**  
Geburtsdatum: 10.04.1981  
Geburtsort: Saarlouis  
Familienstand: ledig

## Beruflicher Werdegang

seit Okt. 2006 Promotion am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Prof. Dr. M.J. Schmitt, Thema der Dissertation: „*In vivo* Topologie und Lokalisation des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p und dessen Funktion bei der Endozytose des viralen K28-Toxins in Hefe“

Mai 2003 bis Apr. 2005 Anstellung als studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik, Homburg, Prof. Dr. A. Scheidig

## Studium

Sept. 2005 bis Aug. 2006 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie, Prof. Dr. M.J. Schmitt, Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur endozytotischen Internalisierung des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p in Hefe.“

2000 – 2006 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes Saarbrücken Abschluss: Diplom (1,4)  
Hauptfach: Molekulare Zellbiologie  
Nebenfächer: Virologie und Genetik

## Schulische Ausbildung

1991 bis 2000 Robert Schuman-Gymnasium Saarlouis  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,6)  
Abiturpreis für das beste Biologieabitur (Note: 14)