

**Endozytose und intrazellulärer Toxintransport
in Hefe- und Säugerzellen mittels
fluoreszenzmarkierter K28-Varianten**

Dissertation

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

von
Diplom-Biologin
Esther Gießelmann

Saarbrücken

2011

Tag des Kolloquiums:	12. Dezember 2011
Dekan:	Prof. Dr. W.F. Maier
Prüfungsausschuss:	
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. M.J. Schmitt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Rettig
Vorsitzender:	Prof. Dr. V. Helms
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. G.-W. Kohring

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
Abstract	10
1. Einleitung	11
1.1. Das Killerphänomen bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.1.1. K28-Prozessierung und Sekretion.....	14
1.1.2. K28-Aufnahme und retrograder Transport	16
1.1.3. Wirkmechanismus von K28.....	20
1.1.4. K28-Immunität	22
1.2. Vergleich K28 – säugerspezifische A/B-Toxine.....	23
1.3. Endozytose in <i>S. cerevisiae</i>	28
1.4. Der HDEL-Rezeptor Erd2p	32
1.5. Ziele und Fragestellung der Arbeit	34
2. Material und Methoden.....	35
2.1. Organismen.....	35
2.1.1. Bakterien	35
2.1.2. Hefen.....	35
2.1.3. Säugerzellen.....	38
2.2. Nährmedien.....	38
2.2.1. Bakterien	39
2.2.2. Hefen.....	39
2.3. Kultivierungsbedingungen.....	44
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	44
2.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Kluyveromyces lactis</i>	44
2.3.3. <i>Pichia pastoris</i>	45
2.3.4. Kryokulturen	45
2.3.5. HeLa-Zellen	45
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	46
2.4.1. Plasmide.....	46
2.4.2. Oligonukleotide.....	54
2.4.3. PCR („polymerase chain reaction“).....	56
2.4.4. „TA-Cloning“	60
2.4.5. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	62
2.4.6. DNA-Konzentrationsbestimmung.....	63

2.4.7. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	64
2.4.8. Restriktionsanalyse.....	65
2.4.9. Agarosegelelektrophorese	66
2.4.10. DNA-Reisolierung aus dem Agarosegel.....	67
2.4.11. Ligation	67
2.4.12. Transformationsmethoden	68
2.5. Hefespezifische Methoden.....	74
2.5.1. Zellzahlbestimmung	74
2.5.2. Herstellung von Toxinkonzentrat.....	74
2.5.3. Fermentation von <i>P. pastoris</i>	75
2.5.4. Agardiffusionstest	78
2.5.5. Sphäroplastierung.....	80
2.5.6. Respirationstest	82
2.5.7. Zellfraktionierung	83
2.5.8. Toxinaufnahmestudien.....	85
2.5.9. Inkubation mit fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten	86
2.5.10. Zellwand-Färbung (Calcofluor White).....	86
2.5.11. FM4-64 Färbung	87
2.5.12. SNAP-Tag-Markierung.....	87
2.6. Fluoreszenzmikroskopie	88
2.6.1. Fluoreszenzfarbstoffe	89
2.6.2. Quenching	90
2.6.3. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	91
2.6.4. Konfokale Laserscanning Mikroskopie	91
2.6.5. „Structured Illumination“ Mikroskopie (SIM)	92
2.6.6. TIRF-Mikroskopie	93
2.7. Säugerzellspezifische Methoden	96
2.7.1. Zellzahlbestimmung	96
2.7.2. Vorbereitung zur Fluoreszenzmikroskopie	96
2.7.3. Inkubation mit fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten	97
2.7.4. Zellaufschluss.....	97
2.8. Proteinbiochemische Methoden.....	98
2.8.1. SDS-PAGE	98
2.8.2. Coomassie-Färbung	100
2.8.3. Silberfärbung	101
2.8.4. Western-Blot-Analyse	102
2.8.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	104

2.8.6. Zellaufschluss <i>E. coli</i>	105
2.8.7. Affinitätschromatographie an Nickelsepharose	105
2.8.8. Umpufferung	107
2.8.9. Anionenaustauschchromatographie	108
2.8.10. Lyophilisierung	109
2.8.11. ATPase-Assay	109
2.9. Chemikalien, Enzyme und Kits	110
3. Ergebnisse	112
3.1. Herstellung fluoreszenzmarkierter K28-Varianten	112
3.1.1. Expression fluoreszenzmarkierter K28-Varianten in <i>K. lactis</i>	114
3.1.2. Expression fluoreszenzmarkierter K28-Varianten in <i>P. pastoris</i>	116
3.1.3. Reinigung fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten	122
3.1.4. Herstellung weiterer fluoreszenzmarkierter K28-Toxinvarianten	124
3.2. Untersuchungen zur Aufnahme fluoreszenzmarkierter K28-Varianten	129
3.2.1. Subzelluläre Fraktionierung sensitiver Hefezellen zur Untersuchung der K28-mCherry ^{HDEL} Aufnahme	129
3.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Hefezellen nach Behandlung mit fluoreszierenden K28-Chimären	131
3.2.3. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von HeLa-Zellen nach Behandlung mit fluoreszierenden K28-Chimären	145
3.3. Untersuchungen zur Erd2p-Kolokalisation an der Plasmamembran	147
3.3.1. Erd2-SNAP-Tag Fusionen zum Nachweis der Erd2p-Plasmamembran- lokalisierung	148
3.3.2. Kolokalisation von Erd2p und FM4-64	151
3.3.3. Funktion des HDEL-Rezeptors Erd2p an der Plasmamembran	153
3.4. Untersuchungen zur endozytotischen K28-Aufnahme und zum intrazellulären Toxintransport durch den HDEL-Rezeptor Erd2p	163
3.4.1. Screening von Mutanten mit Defekten in der Endozytose und dem retrograden Transport	164
3.4.2. Untersuchungen zur Endozytose von K28/Erd2p: „PURE-Pathway“	169
3.4.3. Untersuchungen zur Endozytose von K28/Erd2p: Relevanz weiterer Endozytosemotive	175
3.4.4. Analyse der K28-Rezeptormobilität	191

4. Diskussion.....	197
Herstellung fluoreszenzmarkierter K28-Varianten.....	199
„Live cell imaging“ der K28-Aufnahme.....	211
Plasmamembranlokalisierung des K28-Membranrezeptors Erd2p und deren physiologische Funktion	222
Endozytose des Erd2p/K28-Rezeptor-Liganden/Komplexes.....	230
Ausblick.....	251
5. Zusammenfassung	254
6. Literaturverzeichnis.....	256
Veröffentlichung	279
Danksagung	280

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AGT	O ⁶ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
CD	„caging diameter“
CLSM	„confocal laser scanning microscopy“
CMP	Cetavlon-Mannoprotein
COP	„coat protein complex“
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
d/o	„drop out“
ds	doppelstängig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-2	Elongationsfaktor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FOA	Fluororotsäure
GLB	„gel loading buffer“
GTE	Glukose-Tris-EDTA
HRP	„horseradish peroxidase“
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	„lysogeny broth“
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MBA	Methylenblau-Agar
MCS	„multiple cloning site“

MVB	„multivesicular body“
mTFP	„monomeric teal fluorescent protein“
LiAc	Lithiumacetat
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„revolutions per minute“
SC	„synthetic complete“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	„structured illumination microscopy“
ss	„single strand“, einzelsträngig
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TIRF	„total internal reflection fluorescence“
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	„tris buffered saline“
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TM	Transmembran-
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“
vvm	„volume gas per volume reactor and minute“
w/o	„without“
w/v	„weight per volume“
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
yEGFP	„yeast enhanced green fluorescent protein“
YPD	„yeast extract peptone dextrose“
YPG	„yeast extract peptone galactose“
YNB	„yeast nitrogen base“

Abstract

K28 toxin, secreted by virus-infected killer strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is a α/β heterodimeric protein of the A/B toxin family. After initial binding to the surface of sensitive target cells, K28 is taken up by receptor-mediated endocytosis and transported retrogradely through the secretory pathway. Within the cytosol, the toxin's β -subunit is proteasomally degraded, while α enters the nucleus and causes a G1/S cell cycle arrest and finally cell death. Both, toxin uptake and intracellular transport crucially depend on the cellular HDEL receptor Erd2p which ensures that the toxin is targeted from the plasma membrane to the secretory pathway of intoxicated cells. Thus K28 represents a powerful tool for general studies of endocytosis in eukaryotic cells. To elucidate its trafficking, biologically active K28/mCherry fusion proteins were expressed in *Pichia pastoris* and used to track the toxin's *in vivo* binding to the yeast cell. Thereby, the β -subunit was confirmed to be the cell wall binding component. Plasma membrane localization and endocytic uptake of the K28 receptor Erd2p was approved by fluorescence-based colocalization studies and quantitative measurements of vesicle movement/mobility. Endocytosis of Erd2p was shown to be regulated by multiple mechanisms, amongst which the AP-2 complex was identified as central component required for K28/Erd2p internalisation, thus representing the first example for the involvement of AP-2 in endocytosis in yeast.

Das Toxin K28 wird von virusinfizierten Killerstämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sekretiert und ist als α/β -Heterodimer ein Mitglied der A/B Toxin-Familie. Nach Bindung an die Oberfläche sensibler Zielzellen wird K28 durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und retrograd durch den Sekretionsweg in das Zytosol transportiert. Dort wird die β -Untereinheit proteasomal abgebaut, während α im Zellkern einen G1/S Zellzyklus-Arrest und schließlich den Zelltod auslöst. Die K28-Aufnahme und der intrazelluläre Transport werden durch den zellulären HDEL-Rezeptor Erd2p bestimmt, der die Zielsteuerung des Toxins von der Plasmamembran zum sekretorischen Weg der infizierten Zelle sicherstellt. Daher stellt K28 ein geeignetes Modell-Cargo zur Untersuchung der Endozytose in eukaryotischen Zellen dar. Um das Toxin-Trafficking aufzuklären, wurden biologisch aktive K28/mCherry-Fusionen in *Pichia pastoris* exprimiert und zur Verfolgung der Toxinbindung an die Hefezelle *in vivo* eingesetzt. Dabei stellte sich die β -Untereinheit als Zellwand-bindende Komponente heraus. Die Plasmamembranlokalisation und die endozytotische Aufnahme des K28-Rezeptors Erd2p wurden durch fluoreszenzbasierte Kolokalisationsstudien und quantitative Mobilitätsbestimmungen bestätigt. Die Erd2p-Endozytose wird durch mehrere Mechanismen reguliert, darunter der AP-2 Komplex, der zur K28-Aufnahme erforderlich ist und das erste Beispiel einer Beteiligung von AP-2 Komponenten an der Endozytose in Hefe darstellt.

1. Einleitung

Die Identifikation von Genprodukten, die in die Entstehung und Ausbildung von Krankheiten involviert sind, stellt einen Hauptaspekt der biomedizinischen Forschung dar. Dazu zählen auch Proteine, die von Pathogenen genutzt werden, um in die Wirtszelle zu gelangen und ihre toxische Wirkung zu entfalten. Prominente Beispiele für diesbezüglich medizinisch relevante, bakterielle Toxine sind das Shiga-Toxin, Cholera-Toxin oder Anthrax-Toxin. Die Identifikation von Wirtsproteinen, die an der Ausbildung der Zytotoxizität der Bakteriengifte beteiligt sind, liefert wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung von Therapie-Strategien. Da der Einsatz von humanen Zellen durch die begrenzte genetische Manipulierbarkeit limitiert wird, werden zunehmend Modellorganismen genutzt, um die Prozesse der Intoxikation auf molekularer Ebene beschreiben und verstehen zu können (Di *et al.*, 2011; Slagowski *et al.*, 2008; Rea *et al.*, 2010; Cusick *et al.*, 2009).

1.1. Das Killerphänomen bei *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, auch bekannt als Bier-, Wein- oder Bäckerhefe, stellt einen wichtigen Modellorganismus in der molekular- und zellbiologischen Forschung dar. Das Genom wurde als erstes der Eukaryoten vollständig sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996). Die zum Teil signifikanten Homologien zwischen dem Hefegenom und dem höherer Eukaryoten erlauben es, Rückschlüsse aus Ergebnissen an Hefen auch auf höhere Eukaryoten zu übertragen (Botstein *et al.*, 1997). Zu den weiteren Vorteilen zählen die einfache Kultivierung und genetische Manipulation, da nicht essentielle Hefe-Gene leicht deletiert werden können (Scherer & Davis, 1979; Rothstein, 1983). Viele Erkenntnisse unter anderem zur Zellzykluskontrolle, zur Endozytose oder zu Stoffwechselprozessen basieren auf Untersuchungen an der Hefe *S. cerevisiae* (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003; Petranovic *et al.*, 2010). Aber auch zur Erforschung von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson hat der Einsatz von *S. cerevisiae* mittlerweile entscheidende Beiträge geliefert (Bleackley & MacGillivray, 2011; Braun *et al.*, 2010; van Ham *et al.*, 2009). *S. cerevisiae* besitzt den GRAS-Status („generally recognized as safe“) und gilt damit im Sinne des Lebensmittelrechts als sicher. Daher findet sie nicht nur Verwendung bei der industriellen Herstellung von z. B. Ethanol-Kraftstoff, sondern auch der Lebensmittel- und pharmazeutischen Produktion. Bereits 1981 konnte humanes Interferon rekombinant in *S. cerevisiae* produziert werden (Hitzeman *et al.*, 1981), wobei die Zahl der heterolog exprimierten Proteine stetig zunimmt und die Produktionsbedingungen ständig optimiert werden (Idiris *et al.*, 2010).

In der Lebensmittelherstellung hat *S. cerevisiae* vor allem bei der Brot-, Bier-, Wein- und Essigproduktion eine große Bedeutung. Dabei entdeckten Bevan und Makower 1963 erstmals einen besonderen Phänotyp eines Stammes von *S. cerevisiae*, der aus einer Brauerei isoliert wurde: Durch Sekretion niedermolekularer Proteine oder Glykoproteine, sogenannter Killertoxine, werden sensitive Hefen derselben oder anderer Gattungen ohne direkten Zellkontakt getötet. Die Killerstämme selbst sind immun gegen das von ihnen produzierte Toxin. Der Killerphänotyp verleiht der Hefe einen Wachstumsvorteil in ihrer natürlichen Umgebung, wie Starmer *et al.* (1987) am Beispiel von *Pichia kluyveri* zeigen konnten: Hefemischkulturen, welche aus überreifen Früchten isoliert wurden, enthielten einen großen Anteil an Killerhefen, darunter der Toxinproduzent *P. kluyveri*, der die Verbreitung der sensitiven Hefe *Cryptococcus cereanus* stark einschränkte. Daher werden Killerstämme bevorzugt als Starterkulturen in der Bier- und Weinfermentation verwendet, wodurch Kontaminationen mit anderen, unerwünschten Hefestämmen vermieden werden können und folglich die Produktionsqualität und -quantität gesteigert werden kann (Boone *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 2001; Vagnoli *et al.*, 1993; Magliani *et al.*, 1997). Auch das Wachstum von Nutzpflanzen kann durch den Einsatz von Killerhefen und deren Toxinen positiv beeinflusst werden: Um eine Resistenz gegen phytopathogene Hefen zu erhalten, werden Killertoxine von *Ustilago maydis*, einer Hefe, welche Maispflanzen befällt, in der Nutzpflanze selbst exprimiert. In transgenen Tabakpflanzen führte dies zu einer Sekretion von biologisch aktivem Killertoxin, so dass die Pflanze gegen pathogene Hefen geschützt war (Kinal *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996). Eine wichtige Anwendung ausgewählter Killertoxine ist deren Einsatz als Antimykotika gegen humanpathogene Hefen, da diese zunehmend Resistenzen gegen herkömmliche Präparate entwickeln. Bereits 1986 konnten Polonelli *et al.* einen positiven therapeutischen Effekt nach Behandlung oberflächlicher Mykosen mit einem Killertoxin beobachten. Da Killertoxine vornehmlich die Zellwand der Hefen als Primärrezeptor nutzen, stellen sie eine spezifische und wirkungsvolle Alternative zu den bisher eingesetzten Antimykotika dar (Selitrennikoff, 2001; Schmitt & Breinig, 2002).

Das Killerphänomen wurde auch in einer Vielzahl anderer Gattungen beschrieben, darunter gut charakterisierte Hefen wie *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williospis* und *Zygosaccharomyces* (Yokomori *et al.*, 1988; Gunge *et al.*, 1981, Hayman & Bolen, 1991; Park *et al.*, 1994; Hodgson *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1997). Aber auch weniger intensiv untersuchte Hefen, die aus tropischen oder antarktischen Habitaten isoliert wurden, produzieren Killertoxine, welche unter anderem auch die humanpathogene Hefe *Candida albicans* abtöten (Tan & Tay, 2011, Hua *et al.*, 2010). Die genetische Information zur Ausbildung des Killerphänotyps kann auf linearen doppelsträngigen DNA-Plasmiden lokalisiert sein, welche bei *K. lactis* identifiziert wurden, oder chromosomal kodiert sein, wie für *P. farinosa* beschrieben (Gunge *et al.*, 1981; Suzuki *et al.*, 1994). Die genetische

Grundlage der Killer-Charakteristik bei *S. cerevisiae* beruht auf zytoplasmatisch vererbten dsRNA-Viren. Sie gehören zur *Totiviridae*-Familie, die zu der Klasse der Mykoviren zählen. Bislang wurden drei Killerviren in *S. cerevisiae* näher charakterisiert, welche die Toxine K1, K2 und K28 kodieren (Tipper & Schmitt, 1991; Schmitt & Breinig, 2006). Die Sekretion eines kürzlich identifizierten weiteren Toxins, *Klus*, ist ebenfalls auf die Infektion von *S. cerevisiae* mit einem dsRNA-Virus zurückzuführen (Rodríguez-Cousino *et al.*, 2011). Zur Ausbildung des Killerphänotyps ist das Vorhandensein von zwei verschiedenen dsRNA-Genomen erforderlich, die getrennt voneinander in Form von „virus like particles“ (VLP) enkapsidiert im Zytoplasma vorliegen: das L-A-Helfervirus und das Toxin-kodierende M-Killervirus. Durch Kryoelektronenmikroskopie konnte die Struktur der Partikel analysiert werden: Die Ikosaederförmige Hülle besitzt einen Durchmesser von 430 Å. Die Kapsidwand enthält Poren und fungiert als molekulares Sieb, so dass Transkripte und Metabolite, welche für die RNA-Synthese und Replikation benötigt werden, in das VLP gelangen können, der Austritt von dsRNA und das Eindringen von degradierenden Enzymen aber verhindert wird (Cheng *et al.*, 1994; Caston *et al.*, 1997).

Die RNA des L-A-Helfervirus mit einer Größe von 4,6 kb enthält auf dem positiven Strang zwei „open reading frames“, welche um 130 Nukleotide überlappen: ORF 1 kodiert für das Kapsidprotein Gag, das für die Verpackung und Struktur der viralen Partikel verantwortlich ist. ORF 2 enthält die genetische Information für die RNA-abhängige RNA-Polymerase Pol, welche *in vivo* als Gag-Pol-Fusionsprotein gebildet wird. Die Translation erfolgt durch einen „frame shift“, einen -1 Leserastersprung am Ribosom. Die dsRNA des Killervirus (M1, M2, M28 oder *Mlus*) mit einer Größe von 1,5 bis 2,3 kb kodiert nur für das Präprotoxin, den unprozessierten Vorläufer des reifen sezernierten Killertoxins. Bei den M-Viren handelt es sich somit um Satelliten-Viren, welche die L-A-Helferviren zur Replikation und Verpackung in virale Kapside benötigen (Tipper & Schmitt; 1991; Schmitt & Tipper, 1992; Rodríguez-Cousino *et al.*, 2011; Bostian *et al.*, 1980).

Die Replikation beginnt mit der Transkription des positiven L-A-Strangs, der anschließend in das Zytoplasma der Hefezelle entlassen wird. Dort wird er sowohl als mRNA verwendet und translatiert; gleichzeitig dient er als RNA-Template (Matrize) für die Verpackung in neue Viruspartikel sowie für die Replikation zum dsRNA-Genom. Nach dem Zusammenbau der Virushülle ergänzt das Gag-Pol-Fusionsprotein die (+)ssRNA zur dsRNA. Die Replikation der M-Killerviren verläuft analog, da sie die zur Replikation notwendigen Proteine der Helferviren verwenden. M-Virione können jedoch zwei Kopien der M dsRNA aufnehmen (Wickner, 1996; Esteban & Wickner, 1986). Da sich die Toxin-kodierenden M-Genome (K1, K2, K28) auf replikativer Ebene gegenseitig ausschließen, kann jeweils nur eines in einer Zelle vorliegen (Schmitt & Tipper, 1992).

Die drei Toxine K1, K2 und K28 unterscheiden sich durch ihren Wirkungsmechanismus: K1 induziert die Bildung von Ionenkanälen in der Plasmamembran der Hefe, wobei Kre1p, ein O-glykosyliertes Oberflächenprotein der β -1,6-Glukan-Biosynthese, als Membranrezeptor identifiziert wurde (Martinac *et al.*, 1990; Breinig *et al.*, 2002). Die Toxizität von K2 scheint auf einem ähnlichen ionophoren Mechanismus zu beruhen (Novotná *et al.*, 2004). Das Toxin K28 (Namensgebung: Stamm Nr. 28, isoliert aus Weintrauben) löst einen Zellzyklus-Arrest in der frühen S-Phase aus (Pfeiffer & Radler, 1982; Schmitt *et al.*, 1996). Die folgende Darstellung fokussiert sich auf letzteres. Die Wirkungsweise von *Klus* hingegen ist noch nicht bekannt; Sequenzanalysen deuten ebenfalls auf ein Präprotoxin hin, welches im Verlauf des Sekretionswegs prozessiert wird (Rodríguez-Cousino *et al.*, 2011)

1.1.1. K28-Prozessierung und Sekretion

K1 und K28 gehören zu den am besten charakterisierten viral kodierten Killertoxinen von *S. cerevisiae*. Obwohl sich die Wirkmechanismen grundlegend unterscheiden, laufen die Prozessierung und Sekretion nach dem gleichen Prinzip ab. Dieses entspricht der Prozessierung des präpro- α -Faktors der Hefe *S. cerevisiae* und wurde analog auch in höheren Eukaryoten bei der Prohormon-Konversion beschrieben (Dmochowska *et al.*, 1987; Steiner *et al.*, 1992; Riffer *et al.*, 2002).

Die K28-Toxin-kodierende (+)ssRNA wird in einer ScV-M28 infizierten Hefezelle im Zytoplasma an freien Ribosomen in ein 38 kDa großes Präprotoxin (345 Aminosäuren) translatiert (Schmitt, 1995). Das unprozessierte Vorläufertoxin besteht aus einer hydrophoben N-terminalen ER-Signalsequenz, gefolgt von einer Pro-Region sowie der α - und β -Untereinheit, welche durch die potentiell *N*-glykosylierte γ -Sequenz getrennt sind (Abb. 1). Nach dem posttranslationalen ER-Import durch den Sec61-Komplex, der durch die zytosolischen Chaperone Ssa1p und Ssa2p vermittelt wird, spaltet die membranständige Signalpeptidase (SP) die Prä-Region ab (Breinig *et al.*, 2006). Das luminale Hsp70 Chaperon Kar2p katalysiert die Faltung des Protoxins. Außerdem erfolgt die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 56 (α -Untereinheit) und 340 (β -Untereinheit), katalysiert durch die Protein-Disulfid-Isomerase Pdi1p (Eisfeld, 2001; Sendzig, 2006; Breinig *et al.*, 2006; Riffer *et al.*, 2002).

Die weiteren Prozessierungsschritte werden durch die Peptidasen Kex1p und Kex2p katalysiert und finden in späten Golgi-Kompartimenten statt. Das Enzym Kex2p, eine Subtilisin-ähnliche Endoprotease, spaltet vornehmlich nach Lys-Arg oder Arg-Arg Dipeptiden, so dass die Pro-Region sowie die *N*-glykosylierte γ -Untereinheit entfernt werden (Fuller *et al.*, 1989; Redding *et al.*, 1991). Wie Kex2p ist auch die Carboxypeptidase Kex1p in der Golgi-Membran verankert; letztere entfernt den C-terminalen Argininrest des Toxins

und demaskiert folglich das C-terminale HDEL-Motiv (Schmitt 1995; Redding *et al.*, 1991; Dmochowska *et al.*, 1987; Bryant & Boyd, 1993). Dies ist ein essentieller Schritt während der Toxinprozessierung: Hefezellen, welche eine K28-Variante ohne C-terminalen Argininrest exprimieren, sind zwar weiterhin immun gegen extern appliziertes Toxin, jedoch aufgrund fehlender K28-Sekretion nicht mehr in der Lage, sensitive Hefen abzutöten. Das demaskierte HDEL-Motiv führt zu einer Akkumulation des Toxins im ER, da es sich bei diesem Signal um ein ER-Retentionsmotiv handelt, das normalerweise von löslichen, luminalen ER-residenten Proteinen genutzt wird. Durch die Maskierung des K28-eigenen HDEL-Signals wird die Rückführung in das ER verhindert (Eisfeld *et al.*, 2000). Das reife sekretierte K28-Toxin liegt als Heterodimer vor, wobei die toxizitätsvermittelnde α -Untereinheit (10,5 kDa) über eine Disulfidbrücke mit der zum Zelleintritt und intrazellulären Transport notwendigen β -Untereinheit (11 kDa) verbunden ist, deren C-Terminus das demaskierte HDEL-Motiv trägt (Riffer *et al.*, 2002; Spindler, 2004).

Die Erkenntnisse über die K28-Prozessierung wurden in Analogie zu dem oben beschriebenen Versuch mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese von K28 und Bestimmung der K28-Sensitivität von Deletionsmutanten, welche Defekte in essentiellen Prozessierungsschritten aufweisen, erhalten. Eine abgeschwächte Toxizität der K28-Varianten oder eine Veränderung der K28-Sensitivität von Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp lieferten dabei entscheidende Hinweise auf beteiligte Proteine und essentielle Komponenten des Präprotoxins (Eisfeld *et al.*, 2000; Riffer *et al.*, 2002). Ermöglicht wurde die gezielte Mutation des Toxins erst durch die Isolierung der M28-dsRNA. Schmitt konnte durch *in vivo* Expression der M28-cDNA die Sekretion von biologisch aktivem Toxin induzieren, was den Hefezellen gleichzeitig Immunität gegen das sekretierte K28-Toxin verlieh (Schmitt & Tipper, 1990; Schmitt, 1995; Breinig *et al.*, 2006).

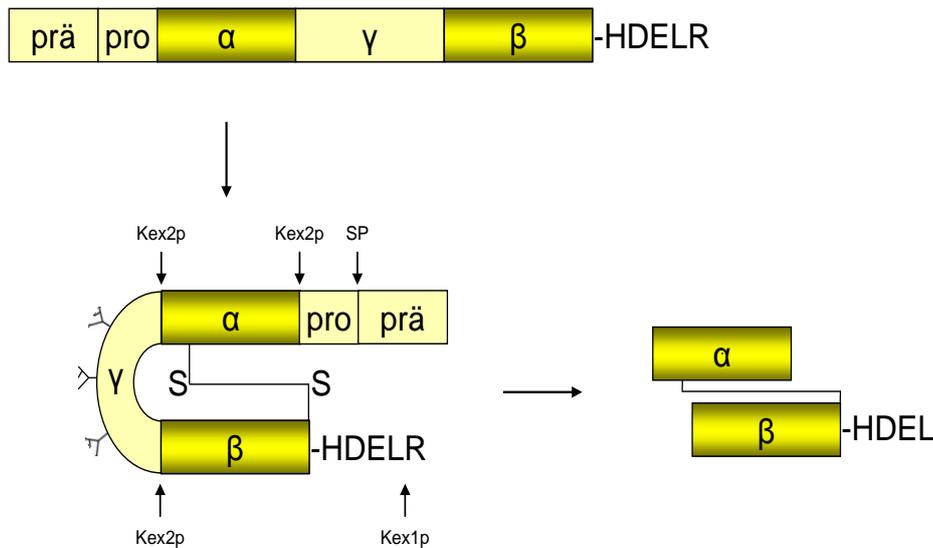


Abb. 1: Schematische Darstellung der K28 Präprotoxin-Prozessierung im Sekretionsweg von *S. cerevisiae*. Das Sekretionssignal, die prä-Region, ermöglicht einen posttranslationalen ER-Import des Vorläufertoxins. Nach dessen Entfernung durch die Signalpeptidase (SP) wird im ER die γ -Untereinheit glykosyliert und eine Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit gebildet. Im späten Golgi-Kompartiment führt die Kex2p-vermittelte Prozessierung weiterhin zur Abspaltung der pro- und γ -Untereinheiten, wobei α und β durch die Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die Carboxypeptidase Kex1p entfernt den C-terminalen Argininrest, wodurch das ER-Retentionssignal demaskiert wird und die Sekretion des prozessierten K28-Toxins erfolgen kann (verändert nach Riffer *et al.*, 2002; Schmitt & Breinig, 2006).

1.1.2. K28-Aufnahme und retrograder Transport

Bei der Toxinaufnahme handelt es sich um einen zweistufigen Mechanismus, der für die drei viral kodierten Killertoxine K1, K2 und K28 beschrieben wurde. Der erste Schritt beinhaltet die schnelle und Energie-unabhängige Bindung an den Primärrezeptor auf Zellwandebene. Der Rezeptor der ionophor wirkenden Toxine K1 und K2 wurde als β -1,6-D-Glukan identifiziert (Hutchins & Bussey; 1983). Die toxische Wirkung von K28 kann durch Inkubation mit gereinigtem Mannoprotein, isoliert aus *S. cerevisiae*, unterbunden werden. Auf diese Beobachtung hin wurden verschiedene Mannoprotein-Mutanten getestet, denen definierte Mannan-Strukturen in der Zellwand fehlen. Mindestens zwei Mannose-Reste müssen in der Seitenkette der äußeren Kette vorhanden sein, um eine Toxinbindung zu ermöglichen; demzufolge handelt es sich beim K28-Zellwandrezeptor im Gegensatz zu den Toxinen K1 und K2 um ein hochmolekulares α -1,3-Mannoprotein der Hefezellwand (Abb. 2). Die Funktion des zweistufigen Mechanismus könnte in der Konzentration des Toxins an der Zelloberfläche liegen. Zudem könnte durch diese Toxin-Akkumulation in Plasmamembrannähe die Wechselwirkung mit dem Sekundärrezeptor gefördert werden (Schmitt & Radler, 1987; Schmitt & Radler, 1988).

Der zweite, Energie-abhängige Schritt beinhaltet die Translokation des Toxins zur Plasmamembran und die Interaktion mit dem Sekundärrezeptor. Erste Hinweise auf eine endozytotische Toxinaufnahme lieferte die K28-Resistenz von temperatursensitiven *end3*- und *end4*-Mutanten. Beide Stämme zeigen Defekte in der frühen Endozytose. Sowohl die Ste2p-vermittelte Internalisierung des α -Faktors als auch die Aufnahme des vakuolären Farbstoffs „lucifer yellow“ sind blockiert (Raths *et al.*, 1993). Nach Zellfraktionierung von K28-behandelten *end3*-Sphäroplasten konnte das Toxin nur noch in der Membranfraktion nachgewiesen werden, da durch die Endozytose-Defekte eine Internalisierung verhindert wurde (Eisfeld *et al.*, 2000).

Die Interaktion mit dem Sekundärrezeptor wird durch das C-terminale HDEL-Signal der K28 β -Untereinheit vermittelt. Dieses Motiv ist essentiell für die Toxinaufnahme, da eine K28 ^{Δ HDEL}-Toxinvariante nicht mehr internalisiert werden kann. Auch zeigten Versuche zur Aufnahme von K28-GFP-Chimären, dass ein C-terminales HDEL-Signal zur Aufnahme ausreichend ist (Eisfeld *et al.*, 2000; Spindler, 2004). Erstmals identifiziert wurde das Motiv bei luminalen ER-Proteinen wie BiP/Kar2p oder Pdi1p, für deren ER-Retention es verantwortlich ist (Munro & Pelham, 1987; Rose *et al.*, 1989; LaMantia *et al.*, 1991). Diese Proteine müssen nach Modifikationen im Golgi-Apparat in das ER zurückgeführt werden, was durch Interaktion mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p und Transport des Rezeptor-Liganden-Komplexes durch COP I („coat protein complex I“) -beschichtete Vesikel geschieht. Die Bezeichnung des HDEL-Rezeptors leitet sich daher ab von „ER retention defective“ (Pelham, 1988; Semenza *et al.*, 1990). Δ *erd2*-Mutanten verhalten sich K28-resistent; sie akkumulieren das Toxin an der Plasmamembran, eine Aufnahme findet nicht statt. Durch Plasmid-getriebene Expression von *ERD2* konnte die K28-Sensitivität wiederhergestellt werden, wobei die Überexpression des HDEL-Rezeptors von „multi-copy“-Plasmiden in einem wildtypischen Stammhintergrund sogar zu einer gesteigerten Toxinaufnahme führte (Heiligenstein, 2008; Denne, 2003). Dies waren erste Hinweise auf eine mögliche Kolokalisation des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran, wo er als Sekundärrezeptor für das Toxin K28 dient (siehe auch Punkt 1.4).

Nach endozytotischer Aufnahme wird der Rezeptor/Liganden-Komplex zu einem endosomalen Kompartiment geleitet und durchläuft den sekretorischen Weg rückwärts. Wie die endosomale Zielsteuerung des Erd2p/K28-Komplexes genau abläuft ist nicht bekannt. Der Transport zum Golgi-Apparat scheint sowohl über das frühe Endosom als auch über das späte Endosom möglich zu sein. Ein Teil der aufgenommenen Toxinmenge wird in der Vakuole abgebaut. Deletionsmutanten mit Defekten in der Sortierung vakuolärer Proteine oder der vakuolären ATPasen verhalten sich hypersensitiv gegenüber K28. Dieser Transportweg scheint durch den pH-Wert beeinflusst zu werden (Heiligenstein, 2008; Eisfeld; 2001). Wie Spindler 2004 durch Zellfraktionierungsexperimente von K28-

behandelten Sphäroplasten zeigen konnte, wird K28 bei einem neutralen pH-Wert verstärkt unspezifisch aufgenommen und zur Vakuole transportiert. Der retrograde Transport des Toxins vom Golgi-Apparat zum ER über COP I-beschichtete Vesikel ist auf eine Interaktion des HDEL-Motivs der K28 β -Untereinheit mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p zurückzuführen. Hefen mit Defekten im ER-Retentionssystem wie Δerd1 oder Δerd2 sind K28-resistent (Hardwick *et al.*, 1990; Eisfeld *et al.*, 2000). Die Disulfid-Brücke, welche die K28-Untereinheiten α und β verbindet, scheint dabei die Zugänglichkeit des K28-eigenen HDEL-Signals zu beeinflussen. Eine K28-Variante, deren Untereinheiten durch eine alternative Disulfid-Brücke verbunden sind, wird nicht mehr retrograd transportiert (Riffer *et al.*, 2002). Im ER-Lumen bewirkt der neutrale pH-Wert eine Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes. Die Interaktion von Ligand und Erd2p-Rezeptor findet im sauren Milieu statt, d. h. im Golgi und in endosomalen Kompartimenten (Wilson *et al.*, 1993). Die pH-Abhängigkeit der Bindung gewährleistet den retrograden Transport des K28-Toxins bis in das ER-Lumen (Abb. 2).

Um seine toxische Wirkung im Zellkern entfalten zu können, muss das Toxin K28 aus dem ER in das Zytosol gelangen. Die Retrotranslokation kann durch den Sec61-Komplex erfolgen, wie bereits für andere bakterielle Toxine wie das Shiga-Toxin oder Cholera-Toxin beschrieben wurde (Yu & Haslam, 2005; Schmitz *et al.*, 2000). Der Sec61-Komplex vermittelt neben dem Proteinimport sekretorischer Proteine auch die Dislokation fehlgefalteter Proteine aus dem ER in das Zytosol, wo deren Abbau erfolgt (Pilon *et al.*, 1997). So nutzen auch Toxine die ER-assoziierte Degradation (ERAD), um das Zytosol der Zielzelle zu erreichen, wobei weitere akzessorische Proteine involviert sind (Hazes & Read, 1997). Die Retrotranslokation von K28 könnte ebenso durch den Sec61-Komplex erfolgen; ein biochemischer Nachweis ist bis dato allerdings noch nicht erbracht (Eisfeld *et al.*, 2000). Kürzlich wurde die Ubiquitin-Ligase Hrd1p, welche ebenfalls als Transmembranprotein in der ER-Membran lokalisiert ist, als Translokationskanal für fehlgefaltete luminal ER-Proteine identifiziert (Carvalho *et al.*, 2010). Die Deletion oder Überexpression von *HRD1* führten jedoch nicht zu einer veränderten K28-Sensitivität (Heiligenstein *et al.*, 2006; Müller, persönliche Mitteilung). Assoziiert mit der Hrd1p-Ligase sind die Mitglieder der Derlin-Familie, welche vor allem in Säugerzellen ebenfalls als möglicher Translokationskanal diskutiert werden (Lilley & Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004). Die Deletion dieser Komponenten hatte keinen Effekt auf die K28-Sensitivität (Heiligenstein *et al.*, 2006). Demzufolge konnte der K28-Translokationskanal noch nicht eindeutig identifiziert werden; eine Beteiligung von Sec63p und der luminalen Chaperone Calnexin, Kar2p, Pdi1p sowie der Hsp40 Co-Chaperone Scj1p und Jem1p an der Retrotranslokation des Toxins konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden. Dennoch stellt K28 kein klassisches ERAD-Substrat dar: Zytosolische Chaperone der Ssa-Familie sind nicht involviert. Auch scheint die

Retrotranslokation nicht von einer Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation des Toxins abhängig zu sein. Eine K28-Toxinvariante, deren Lysinreste durch Arginin ersetzt wurden, konnte weiterhin das Zytosol erreichen und zeigte keine veränderte Toxizität (Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein *et al.*, 2006; Kelkel, 2009). Ein entscheidender Einfluss auf die K28-Retrotranslokation kommt der Calcium-Konzentration im ER-Lumen zu. Ähnlich einer mutierten Variante der Carboxypeptidase, CPY*, akkumuliert auch K28 im ER einer $\Delta pmr1$ -Mutante, da durch Ausfall der Ca^{2+}/Mn^{2+} ATPase der Calciumspiegel im ER um 50 % fällt und die Retrotranslokation inhibiert wird. K28 reagiert in diesem Fall ebenso wie das bekannte ERAD-Substrat CPY* auf die veränderte Calcium-Konzentration im ER (Dürr *et al.*, 1998; Heiligenstein *et al.*, 2006; Strayle *et al.*, 1999).

K28 wird als α/β -Heterodimer durch Retrotranslokation aus dem ER exportiert; eine vollständige Entfaltung ist hierzu nicht notwendig (Eisfeld *et al.*, 2000; Tirosh *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass durch die im Zytosol herrschenden reduzierenden Bedingungen die Disulfid-Brücke zwischen der α - und β -Untereinheit gespalten wird, so dass die α -Untereinheit den Nukleus erreichen kann. K28 β hingegen wird nach Ubiquitinierung im Proteasom degradiert (Heiligenstein *et al.*, 2006).

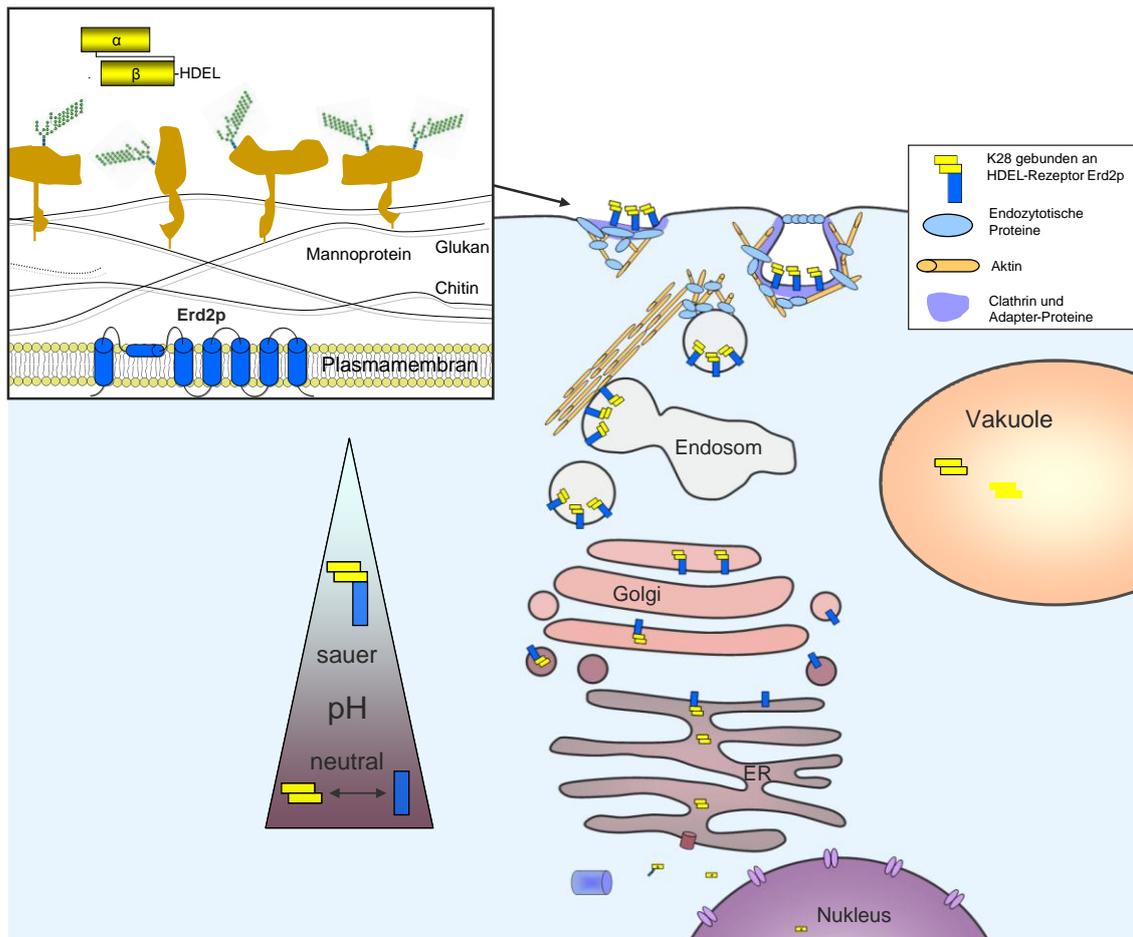


Abb. 2: Schema der K28-Endozytose und des retrograden Transports. Nach Bindung des Toxins K28 an den Primärrezeptor auf Zellwandebene, ein hochmolekulares α -1,3-Mannoprotein, erfolgt der Energie-abhängige Transport zur Plasmamembran, wo K28 über das C-terminale HDEL-Motiv mit dem Sekundärrezeptor, dem HDEL-Rezeptor Erd2p, interagiert, der in geringer Kopienzahl an der Plasmamembran kolokalisiert. Der Toxin/Rezeptor-Komplex wird durch Clathrin- und Aktin-vermittelte Endozytose internalisiert und zum frühen Endosom transportiert. Durch COP I-beschichtete Vesikel gelangt der Komplex retrograd über den Golgi-Apparat zum ER. Der neutrale pH-Wert im ER-Lumen führt zu einer Dissoziation des Toxins von Erd2p, so dass K28 durch Retrotranslokation das Zytosol erreicht und der Rezeptor recycelt werden kann. Vermutlich durch die reduzierenden Bedingungen kommt es im Zytosol zu einer Spaltung der K28-Disulfidbrücke. Während die β -Untereinheit ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird, gelangt K28 α durch passive Diffusion in den Zellkern, wodurch ein Zellzyklus-Arrest ausgelöst wird. Die Rezeptor-unabhängige K28-Aufnahme durch „fluid-phase“ Endozytose findet hauptsächlich bei einem neutralen pH-Wert statt und führt zu einer Degradation von K28 in der Vakuole (erweitert nach Schmitt & Breinig, 2006).

1.1.3. Wirkmechanismus von K28

Die meisten viralen Killertoxine, darunter auch das *Zygosaccharomyces bailii* Toxin Zygocin und das *S. cerevisiae* Toxin K1, wirken als Ionophore und zerstören durch Bildung Kation-spezifischer Poren die Integrität der Plasmamembran (Martinac *et al.*, 1990; Weiler *et al.*, 2002; Breinig *et al.*, 2002; Weiler & Schmitt, 2003). Das Toxin K28 der Hefe *S. cerevisiae* stellt hierbei eine Ausnahme dar, da die toxische Wirkung vermutlich im Zellkern vermittelt wird. K28 löst einen Wachstumsstopp aus, was auf einer irreversiblen Inhibierung der DNA-

Synthese beruht. Die Zellen besitzen eine mittelgroße Knospe, der Zellkern bleibt in der Mutterzelle lokalisiert. Der präreplikative DNA-Gehalt deutet auf einen Arrest in der frühen S-Phase hin (Schmitt *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1996). Zymocin, ein Plasmid-kodiertes Killertoxin produziert von *K. lactis*, fungiert als tRNA-Anticodon-Nuklease und löst ebenfalls einen Zellzyklus-Arrest aus. Die Zellen arretieren jedoch in der G1-Phase mit präreplikativem DNA-Gehalt und bilden keine Knospen aus (Butler *et al.*, 1991; Schaffrath & Breunig, 2000; Mehlgarten & Schaffrath, 2003; Lu *et al.*, 2005; Keppetipola *et al.*, 2009).

Die bisherigen Untersuchungen zum molekularen Hintergrund ergaben, dass die zytotoxische K28 α -Untereinheit durch passive Diffusion in den Nukleus gelangen kann, da ihr Molekulargewicht nur 10,5 kDa beträgt. Zudem weisen Mutanten mit Defekten im Kernporenkomplex eine deutlich veränderte K28-Sensitivität auf. Ein aktiver Kernimport konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings führte das Anfügen eines Kernlokalisationsignals (NLS) zu einer gesteigerten Toxizität (Reiter, 2004). Der mikroskopische Nachweis von K28 α im Zellkern konnte bislang nicht erbracht werden. Biochemischen Analysen zufolge interagiert K28 α mit dem TATA-Bindeprotein, was auf eine Kernlokalisierung der K28 α -Untereinheit schließen lässt. Außerdem konnte eine Wechselwirkung der α -Untereinheit mit einer Komponente des „anaphase-promoting-complex“ (APC) nachgewiesen werden, wodurch dieser gehemmt wird und B-Typ-Zykline stabilisiert werden (Reiter, 2004). Der genaue Ablauf dieser Ereignisse konnte bisher nicht aufgeklärt werden; die Toxinkonzentration hat dabei jedoch einen entscheidenden Einfluss: Bei einer hohen K28-Konzentration (> 10 pM) kommt es zu einem nekrotischen Absterben der Hefezellen. Herrscht eine niedrige Toxinkonzentration (< 1 pM), induziert K28 die Apoptose, welche durch DNA-Fragmentierung, Chromatin-Kondensation, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und eine veränderte Plasmamembranzusammensetzung gekennzeichnet ist. Die Caspase Yca1p ist an der K28-induzierten Apoptose in einem frühen Stadium beteiligt, da deren Deletion zu einer starken Reduktion der Apoptose-Marker und einer verminderten K28-Sensitivität führt (Reiter, 2004; Reiter *et al.*, 2005; Schmitt & Reiter, 2008). Eine niedrige K28-Konzentration, welche zur Induktion der Apoptose führt, entspricht der *in vivo* Situation in dem natürlichen Lebensraum der Killerhefen (Starmer *et al.*, 1987). Somit scheint dies einen wichtigen Prozess zur effizienten Abtötung der sensitiven Nicht-Killerhefen darzustellen.

1.1.4. K28-Immunität

Für Killerhefen ist die Immunität gegen das von ihnen selbst sezernierte Toxin ein essentieller Mechanismus. Die Killertoxine greifen spezifisch eukaryotische Zellen an und inhibieren deren Zellfunktionen. Im Gegensatz dazu bilden Proteintoxin-produzierende Bakterien wie *Shigella dysenteriae* oder *Corynebacterium diphtheriae* keine protektive Immunität aus, da die produzierten Toxine selektiv eukaryotische Zellen abtöten.

Die Immunität von K1-produzierenden Hefezellen ist vermutlich auf eine Interaktion des Toxinrezeptors Kre1p mit dem Protoxin zurückzuführen. Beide bilden im Sekretionsweg einen Komplex, der in der Vakuole degradiert wird (Schmitt & Breinig, 2006; Sturley *et al.*, 1986; Douglas *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 1993). K28-produzierende Hefezellen dagegen nehmen das K28-Toxin auf und transportieren es retrograd bis in das Zytosol. Dort liegen sowohl das aufgenommene Heterodimer als auch der unprozessierte Toxinvorläufer vor, der als Präprotoxin posttranslational in das ER importiert wird, und können einen Komplex bilden. Wird die Prä-Region durch ein kotranslationales ER-Importsignal, wie das weitaus hydrophobere K1-Signal-Peptid, ersetzt, nimmt die Funktionalität der K28-Immunität stark ab. Demgemäß muss eine bestimmte Präprotoxin-Menge im Zytosol vorhanden sein, um das internalisierte Toxin „abfangen“ zu können. Mit Hilfe einer His-markierten K28-Variante konnte der Komplex aus Präprotoxin und internalisiertem Heterodimer isoliert und die Interaktion bestätigt werden (Breinig *et al.*, 2006). Im Komplex mit dem Präprotoxin wird das aufgenommene reife Toxin im Zytosol ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, so dass das Präprotoxin mit weiteren K28-Heterodimeren komplexieren kann oder in das ER importiert und sezerniert werden kann. Daher führt eine verminderte proteasomale Degradation zu einer starken Abnahme der K28-Sekretion und einer Zunahme der Toxinsensitivität. Durch die Blockade werden die Komplexe aus K28-Präprotoxin und internalisiertem K28-Heterodimer nicht abgebaut, so dass weniger Präprotoxin in das ER importiert wird und keine weiteren Heterodimere mehr abgefangen werden können (Breinig *et al.*, 2006).

Zusammenfassend beruht die Immunität gegen das K28-Toxin auf einer spezifischen Interaktion zwischen internalisiertem K28 und dem Präprotoxin im Zytosol der K28-produzierenden Zelle. Der dabei gebildete Komplex wird nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut. Ein Teil des Präprotoxins entgeht diesem Mechanismus und kann in das ER importiert und sezerniert werden oder wiederum aufgenommenes K28-Heterodimer komplexieren. Auf diese Weise wird das internalisierte Toxin inaktiviert, bevor die zytotoxische α -Untereinheit ihr Zielkompartiment erreichen kann. Durch den posttranslationalen ER-Import des Präprotoxins wird gewährleistet, dass genügend Toxinvorläufer vorhanden ist, um internalisiertes K28 zu komplexieren und weiterhin die Toxinsekretion aufrechtzuerhalten (Breinig *et al.*, 2006; Schmitt & Breinig, 2006).

1.2. Vergleich K28 – säugerspezifische A/B-Toxine

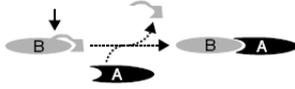
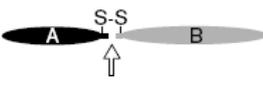
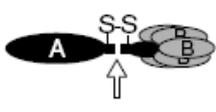
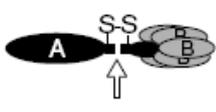
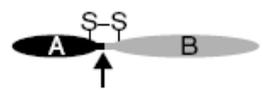
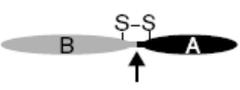
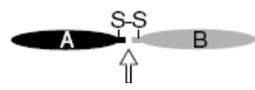
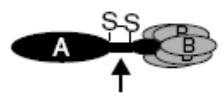
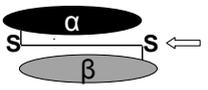
Auch Bakterien und Pflanzen produzieren eine große Vielfalt an Proteinen, die hoch toxisch auf Säugerzellen wirken, da es ihnen gelingt das Zytosol der Zelle zu erreichen und essentielle Komponenten anzugreifen. Dabei nutzen sie als „opportunistische Liganden“ verschiedene Schritte des zellulären Membran-Traffickings (Sandvig & van Deurs, 2002). Diese Proteine gehören größtenteils zur Gruppe der A/B-Toxine, was auf ihren strukturellen Aufbau zurückzuführen ist. Die A-Untereinheit besitzt im Allgemeinen enzymatische Aktivität und entfaltet diese im Zytosol der Zielzelle, so dass die zelluläre Physiologie stark beeinflusst wird oder es sogar zu einem Absterben der Zelle kommt. Im Gegensatz dazu ist das aus einer oder mehreren Untereinheiten bestehende B-Segment für die Bindung an die Zelloberflächenrezeptoren und teilweise auch für den intrazellulären Transport der heteromeren Toxine verantwortlich. Eine Disulfidbrücke bildet meist die Verbindung zwischen der A- und der B-Untereinheit (Falnes & Sandvig, 2000).

Prominente humanpathogene Vertreter dieser Toxinklasse sind z. B. Cholera-Toxin, Diphtherie-Toxin, Anthrax-Toxin, Shiga-Toxin sowie clostridiale Neurotoxine wie das Botulinum-Toxin oder das Tetanus-Toxin. Zu den von Pflanzen produzierten A/B-Toxinen zählen Ricin, Abrin, Modeccin und Viscumin (Tab. 1). Besonders die Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* Stämme stellen ein wachsendes Gesundheitsproblem dar, da sie verschiedenste Nahrungsmittel kontaminieren und das lebensbedrohliche hämolytisch urämische Syndrom (HUS) auslösen können (Sandvig *et al.*, 2010; Palermo *et al.*, 2009; Tarr *et al.*, 2005; Rubino *et al.*, 2011; Chattaway *et al.*, 2011).

Proteintoxine werden meist als inaktive Form synthetisiert und müssen durch proteolytische Prozessierung aktiviert werden. Diese Spaltung kann sowohl im Toxinproduzenten (z. B. Cholera-Toxin, Ricin) als auch in der Zielzelle (z. B. Diphtherie-Toxin, Shiga-Toxin) vollzogen werden. Eine Ausnahme bilden das Anthrax-Toxin sowie das *Clostridium botulinum* C2 Toxin, da die B-Untereinheit erst nach proteolytischer Prozessierung die A-Untereinheit binden kann (Gordon & Leppla, 1994).

Das virale Killertoxin K28 der Hefe *S. cerevisiae* weist große Homologien zu den bakteriell produzierten A/B Toxinen auf. Die α - und β -Untereinheiten können in ihrem strukturellen Aufbau und ihrer Funktion den A- und B-Untereinheiten von A/B Toxinen zugeordnet werden: K28 α besitzt zytotoxische Aktivität, während die β -Untereinheit die Internalisierung und den retrograden Transport vermittelt. Beide sind ebenfalls durch eine Disulfidbrücke verbunden.

Tab. 1: A/B Toxine, ihre Struktur und Wirkungsweise. Die proteolytische Spaltung in die enzymatisch aktive A-Untereinheit (schwarz) und die B-Untereinheit (grau) kann durch Proteasen des Toxinproduzenten (weißer Pfeil) oder der Zielzelle (schwarzer Pfeil) katalysiert werden (nach Falnes & Sandvig, 2000; Sandvig & van Deurs, 2002, verändert). EF-2: Elongationsfaktor 2, MAPKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, n. v.: nicht vorhanden.

Toxin-Produzent	Struktur	ER-Retentions-signal	Aktivität/Zielprotein
Anthrax-Toxin <i>Bacillus anthracis</i>		n. v.	Ödemfaktor: Adenylat-Zyklase/cAMP ↑ Letalfaktor: Zink- Endoprotease/MAPKK
Botulinum-Toxin <i>Clostridium botulinum</i>		n. v.	Zink-Endoprotease/ VAMP/Synaptobrevin, SNAP-25, Syntaxin 1
Cholera-Toxin <i>Vibrio cholerae</i>		KDEL	ADP-Ribosyltransferase/ heterotrimeres G-Protein
E. coli Hitze-labiles Toxin <i>Escherichia coli</i>		RDEL	
Diphtherie-Toxin <i>Corynebacterium diphtheriae</i>		n. v.	ADP-Ribosyltransferase/ EF-2
Pertussis-Toxin <i>Bordetella pertussis</i>		n. v.	ADP-Ribosyltransferase/ heterotrimeres G-Protein
Pseudomonas Exotoxin A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		REDL	ADP-Ribosyltransferase/ EF-2
Ricin <i>Ricinus communis</i>		n. v.	N-Glykosylase/28S rRNA
Shiga-Toxin <i>Shigella dysenteriae</i>		n. v.	N-Glykosylase/28S rRNA
K28 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		HDEL	?

Die bakteriellen A/B-Toxine binden vorwiegend an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wobei das pflanzliche Toxin Ricin unspezifisch an oberflächliche Kohlenhydratstrukturen bindet (Sandvig & van Deurs, 1996). Durch die Interaktion mit dem Rezeptor kann die weitere Zielsteuerung des Toxins vermittelt werden, was z. B. für den retrograden Transport des Shiga-Toxins essentiell ist (Arab & Lingwood, 1998; Johannes & Römer, 2010). Ebenso wird durch die Bindung des *S. cerevisiae* Toxins K28 an den HDEL-Rezeptor auf Ebene der Plasmamembran der weitere retrograde Toxintransport ermöglicht.

Bis auf wenige Ausnahmen werden A/B Toxine durch Endozytose internalisiert, bevor die Translokation in das Zytosol stattfindet (Rogel & Hanski, 1992). Proteintoxine nutzen dabei verschiedene Endozytose-Mechanismen, die sowohl Clathrin-vermittelt als auch Clathrin-unabhängig ablaufen können. Allerdings sind die Prozesse bisher in Bezug auf die molekularen Interaktionen kaum charakterisiert (Sandvig & van Deurs, 2002; Sandvig *et al.*, 2010). Dieser Punkt weist eine weitere Parallele mit dem ebenfalls endozytotisch aufgenommenen K28-Toxin der Hefe auf.

Diphtherie-Toxin und Anthrax-Toxin sind Beispiele für eine direkte Translokation von den Endosomen in das Zytosol. Der niedrige pH-Wert in diesem Kompartiment induziert eine Konformationsänderung im Toxinmolekül, so dass sich hydrophobe Bereiche in die endosomale Membran einlagern können und eine Translokation der enzymatisch aktiven Untereinheit ermöglichen (Sandvig *et al.*, 1981; Collier, 2001).

Andere Toxine wie Ricin, Shiga-Toxin, Cholera-Toxin oder Pertussis-Toxin werden nach der Internalisierung retrograd zum Golgi-Apparat transportiert (Sandvig & van Deurs, 2000; Sandvig, 2001; el Baya *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 1979). Die intensiv untersuchten Toxine Ricin und das Shiga-Toxin können dabei direkt von einem frühen endosomalen Kompartiment den Golgi erreichen (Mallard *et al.*, 1998; Iversen *et al.*, 2001). Der weitere retrograde Transport zum ER kann über COP I-beschichtete Vesikel nach Bindung des Cargo-Proteins an den KDEL-Rezeptor verlaufen. Ein entsprechendes ER-Retentionssignal wurde bei drei Proteintoxinen identifiziert, wobei das REDLK-Motiv des *Pseudomonas* Exotoxin A durch Entfernung des terminalen Lysinrests erst demaskiert werden muss (Hessler & Kreitman, 1997). Jackson *et al.* konnten 1999 zeigen, dass die Expression von Lysozym mit C-terminalem KDEL-Signal, welche zu einer Absättigung der KDEL-Rezeptoren führte, die Exotoxin A-Zytotoxizität reduziert. Dieses Toxin nutzt folglich das KDEL-Retentionssystem, um das ER zu erreichen (Chaudhary *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1999). Die ER-Retentionssignale des Cholera-Toxins (-KDEL) und des Hitze-labilen *E. coli* Toxins (-RDEL) ermöglichen ebenfalls eine Bindung an den KDEL-Rezeptor und einen COP I-vermittelten retrograden Transport in das ER. Diese beiden Toxine können jedoch ebenso wie das Shiga-Toxin ohne ER-Retentionssignal noch weitere COP I-unabhängige Wege nutzen, um vom Golgi in das ER zu gelangen, welche jedoch noch nicht hinreichend charakterisiert werden konnten (Lencer *et al.*, 1995; Girod *et al.*, 1999; McKenzie *et al.*, 2009). Das *S. cerevisiae* Toxin K28 nutzt ebenfalls den COP I-vermittelten Transport, um retrograd vom Golgi in das ER transportiert zu werden. Das C-terminale HDEL-Motiv ermöglicht dabei eine Interaktion mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p, dem *S. cerevisiae*-Homolog der humanen KDEL-Rezeptoren, von denen bisher drei Varianten mit unterschiedlicher Spezifität identifiziert wurden (Semenza *et al.*, 1990; Lewis & Pelham, 1990; Raykhel *et al.*, 2007).

Die ER-Retrotranslokation der Toxine in das Zytosol findet nach Reduktion der internen Disulfidbrücke statt, welche die enzymatisch aktive Untereinheit mit dem restlichen Molekül verbindet. Im Falle von Cholera-Toxin ist die Protein-Disulfid-Isomerase an dieser Spaltung beteiligt (Tsai *et al.*, 2001; Forster *et al.*, 2006). Ricin, *Pseudomonas* Exotoxin A, Shiga-Toxin und Cholera-Toxin konnten im Gegensatz zu K28 eindeutig biochemisch im Komplex mit Sec61p nachgewiesen werden (Wesche *et al.*, 1999; Koopmann *et al.*, 2000; Yu & Haslam, 2005; Schmitz *et al.*, 2000). Als ERAD-Substrate nutzen sie vermutlich diesen Weg der Proteintranslokation (Lord *et al.*, 2005). Shiga-Toxin interagiert dabei mit luminalen Chaperonen wie BiP und HEDJ, was die Interaktion mit dem Sec61 Translokon einleiten könnte (Johannes & Römer, 2010; Yu & Haslam, 2005; Falguieres & Johannes, 2006). Ähnlich wie K28 α haben die enzymatischen Untereinheiten nur einen sehr geringen Lysingehalt und können sich so dem proteasomalen Abbau im weitgehend Zytosol entziehen. Jedoch konnte im Unterschied zu K28 durch Inhibierung der proteasomalen Degradation die Toxizität deutlich gesteigert werden (Lord *et al.*, 2005; Hazes & Read, 1997; Tam & Lingwood, 2007; Deeks *et al.*, 2002).

Die Wirkungsweise der A/B Toxine ist in Tab. 1 zusammengefasst. Sie reicht von der Hemmung der Translation bis zur Inhibierung der synaptischen Erregungsleitung. Die Aktivität von K28 α konnte allerdings bisher nicht bestimmt werden. Die Toxinbehandlung führt abhängig von der Konzentration zu einem apoptotischen oder nekrotischen Zelltod (Punkt 1.1.3). Shiga-Toxin, Ricin und Anthrax-Toxin sind Beispiele für bakterielle A/B-Toxine, welche abhängig vom Zelltyp ebenfalls Apoptose auslösen können (Lee *et al.*, 2008; Johannes & Römer, 2010; Rao *et al.*, 2005; Moayeri & Leppla, 2009t). Diese Eigenschaft der katalytischen A-Untereinheit wird genutzt, um in Fusion mit einem Targeting-Molekül, das spezifisch die Internalisierung in eine Tumorzelle vermittelt, gezielt deren Apoptose einzuleiten (Thorburn *et al.*, 2004). Das einzige bisher zugelassene Medikament besteht aus einer Diphtherie-Toxinfusion, wobei Interleukin-2 als Zell-bindende Komponente dient. Die weitere Erforschung der Proteintoxine, besonders deren Internalisierung, führt jedoch zu einer stetigen Verbesserung dieser Methode (Wong *et al.*, 2007; Sandvig *et al.*, 2010). Darüber hinaus werden A/B Toxine als Carrier eingesetzt, um Peptide und Proteine in das Zytosol der Zielzelle einzuschleusen. So kann die B-Untereinheit des Shiga-Toxins, deren Rezeptoren vor allem von Krebszellen exprimiert werden, zur Diagnose und Behandlung dienen, was im Mausmodell bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Engedal *et al.*, 2011; Viel *et al.*, 2008). In der Grundlagenforschung stellen A/B Toxine wichtige Instrumente dar, mit deren Hilfe Prozesse wie Endozytose und Proteintranslokation untersucht werden können (Schiavo & van der Goot, 2001; Sandvig & von Deurs, 2005). 1992 wurde auf diese Weise erstmals der retrograde Transport von der Zelloberfläche bis in das ER am Beispiel des Shiga-Toxins beschrieben (Sandvig *et al.*, 1992). Mittlerweile werden A/B Toxine zur

Charakterisierung und Unterscheidung von Transportwegen, aber auch der Wechselwirkungen zwischen endozytotischen und biosynthetischen Prozessen eingesetzt (Johannes & Goud, 2000; Schiavo & van der Goot, 2001).

Das Wissen um die Wirkungsweise der A/B-Toxine in der Zielzelle beruht häufig auf mikroskopischen Daten, wobei das „live cell imaging“ in den Vordergrund rückt. Im Unterschied zur Immunfluoreszenz, welche eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen voraussetzt, ermöglicht diese Technik die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen. Dazu werden die Proteintoxine oder die zu untersuchende Untereinheit mit einem Fluorophor gekoppelt und die Aufnahme und der intrazelluläre Transport in der Zielzelle fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Mit Hilfe einer Cy3-markierten B-Untereinheit des Shiga-Toxins wurde beispielsweise erstmals ein direkter Transportweg vom frühen endosomalen Kompartiment zum Golgi nachgewiesen (Mallard *et al.*, 1998). Die Internalisierung von Anthrax-Toxin wurde bisher mit Zellfraktionierungs- und Elektronenmikroskopie-Studien untersucht. Erst die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Letalfaktor und Ödemfaktor ermöglichte, deren Aufnahme parallel in der gleichen lebenden Zelle im Zeitverlauf zu analysieren. Diese Versuchsbedingungen kommen der *in vivo* Situation sehr nahe, in der beide Faktoren durch *Bacillus anthracis* freigesetzt werden (Zornetta *et al.*, 2010).

Mit dem Killerphänomen der Hefe *S. cerevisiae* existiert ein zu den bakteriellen und pflanzlichen A/B-Toxinen in weiten Teilen homologes System, wobei vor allem das als Killertoxin K28 als Modell geeignet ist. Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, entsprechen die Aufnahme und der retrograde Transport von K28 in vielen Punkten dem der A/B-Toxine in Säugerzellen. Die Frage, ob dieses System auch auf höhere Eukaryoten übertragen werden kann, konnte bisher nicht eindeutig beantwortet werden. Eine große Schwierigkeit stellen unter anderem die Applikationsbedingungen dar: Die optimale Wirkung entfaltet K28 in einer Umgebung, die sowohl was Temperatur als auch den pH-Wert anbelangt, dem natürlichen Habitat der Killerhefen entspricht (Starmer *et al.*, 1987). Auch sollte das Toxin in möglichst reiner Form vorliegen, da bereits der Überstand einer Hefekultur die Vitalität von Säugerzellen negativ beeinflussen kann (Kelkel, 2009). Spindler (2004) konnte jedoch durch intrazelluläre Plasmid-getriebene Expression von K28 α -Varianten eine 50%ige Wachstumsinhibierung einer adhärennten Säugerzelllinie beobachten. Die Aufklärung der Wirkung von extern appliziertem K28 Toxin auf Säugerzellen bleibt daher die Voraussetzung, um K28 als Modell für die Internalisierung von A/B-Toxinen in höheren eukaryotischen Zellen nutzen zu können.

1.3. Endozytose in *S. cerevisiae*

Die Endozytose ist in eukaryotischen Zellen ein essentieller mehrstufiger Prozess, bei welchem die Zelle selektiv Plasmamembranproteine und -lipide sowie extrazelluläre Makromoleküle wie Nährstoffe und Peptidhormone aufnimmt. Darüber hinaus wird dieser Mechanismus von Pathogenen und Proteintoxinen genutzt, um das Zellinnere zu erreichen. Obwohl Vertreter der A/B-Toxinfamilie zur Identifizierung verschiedener Endozytose-Wege entscheidend beigetragen haben, sind die molekularen Grundlagen bisher kaum verstanden (Sandvig *et al.*, 2010). Da große Teile dieser endozytotischen Mechanismen evolutionär konserviert sind, hat sich zu deren Aufklärung und der Identifikation beteiligter Komponenten die Hefe *S. cerevisiae* als sehr geeignet erwiesen, wobei der Fokus auf der Internalisierung von Plasmamembran-Transportern und Pheromon-Rezeptoren liegt (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003; Kaksonen *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2001; Lauwers *et al.*, 2010).

Die Clathrin-abhängige Endozytose in Hefezellen kann in mehrere Schritte unterteilt werden. Diese Einteilung basiert unter anderem auf „live cell imaging“ Experimenten mit fluoreszenzmarkierten Endozytose-Proteinen in Deletionsmutanten, kombiniert mit genetischen, biochemischen und pharmakologischen Tests (Toret & Drubin, 2006). Zunächst wurden Eisosome, stabile zytosolische Proteinstrukturen unterhalb der Plasmamembran, als „Startpunkte“ für die Endozytose postuliert (Walther *et al.*, 2006). 2008 hingegen wurden diese Organelle mit dem MCC, dem „membrane compartment of Can1p“ kolokalisiert (Grossmann *et al.*, 2008; Fröhlich *et al.*, 2009). MCC sind isolierte Bereiche der Plasmamembran, welche viele Sterole und spezifische Proteine enthalten (Grossmann *et al.*, 2007; Malinska *et al.*, 2003; Malinska *et al.*, 2004). Diese lateralen Membrandomänen besitzen neben einer spezifischen Zusammensetzung und Funktion eine besondere Struktur in der Plasmamembran der Hefe (Stradalova *et al.*, 2009; Loibl *et al.*, 2010). Die Ausbildung der MCC scheint von eisosomal Proteinen abhängig zu sein. Des Weiteren wurden klassische Endozytose-Marker nur außerhalb der MCC und damit außerhalb der Eisosomen identifiziert (Grossmann *et al.*, 2008). Mit Hilfe von quantitativem „live cell imaging“ konnte jedoch der Einfluss der MCC-Bereiche auf die Regulation des vesikulären Traffickings nicht bestätigt werden (Brach *et al.*, 2011).

Die Endozytose beginnt mit der Akkumulation von Proteinen an der Plasmamembran, gefolgt von der Einstülpung und Abschnürung des gebildeten Vesikels, welches sich schließlich von der Plasmamembran ablöst. Bisher wurden mehr als 60 Proteine identifiziert, die an diesem invarianten Prozess beteiligt sind (Abb. 3; Michelot *et al.*, 2010). Die ersten Proteine, welche an der Endozytose-Stelle beobachtet werden konnten, sind Clathrin sowie Adapter-Proteine wie Ede1p (Gagny *et al.*, 2000; Kaksonen *et al.*, 2005; Newpher *et al.*, 2005). Das Strukturprotein Clathrin bildet die Vesikelhülle aus, ist aber nicht essentiell für die Endozytose in *S. cerevisiae*, sondern notwendig für die korrekte Rekrutierung weiterer endozytotischer

Proteine (Pearse, 1975; Kaksonen *et al.*, 2005; Newpher & Lemmon, 2006). Die Verbindung zwischen dem zu endozytierenden Protein und der Clathrin-Hülle wird durch zahlreiche weitere Adapterkomponenten hergestellt, beispielsweise durch Sla2p und den Pan1-Komplex. Er beinhaltet neben dem essentiellen Protein Pan1p die Komponenten End3p und Sla1p und dient als Adapter, der die Cargo-Proteine mit dem Aktin- und Clathrinnetzwerk verbindet (Wendland *et al.*, 1998; Wendland & Emr, 1998; Howard *et al.*, 2002; Huang & Cai, 2006). Dieses erste „coat“ Modul dient der Rekrutierung des Cargo-Proteins und bewirkt wahrscheinlich durch Interaktion mit Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat bereits eine leichte Krümmung der Plasmamembran, was die spätere Einstülpung erleichtert (Sun *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Wendland *et al.*, 1999). Des Weiteren beinhaltet dieses Modul Proteine, welche die Aktinpolymerisation veranlassen (Roberston *et al.*, 2009). Pan1p bindet und aktiviert den Arp2/3 Komplex, der die Aktin-Assemblierung einleitet, was parallel mit dem Verschwinden des frühen Endozytose-Proteins Ede1p stattfindet (Duncan *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2003). Sla1p wiederum wirkt als negativer Regulator der Aktinpolymerisation, da es das Arp2/3 aktivierende Protein Las17p hemmt (Winter *et al.*, 1997; Madania *et al.*, 1999; Rodal *et al.*, 2003). Das humane Ortholog zu diesem Protein ist das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein WASP, das bei der entsprechenden Erbkrankheit in mutierter Form vorliegt und zur Ausbildung einer Immunschwäche führt (Thrasher & Burns, 2010).

Wie genau die Cargo-Erkennung und Rekrutierung der endozytotischen Proteine abläuft, ist nicht bekannt. Ein Beispiel ist die Internalisierung des α -Faktor-Transporters Ste6p, welche weitestgehend aufgeklärt wurde und nach dem „PURE-Pathway“ („phosphorylation, ubiquitination, recognition and endocytosis“) abläuft (Kelm *et al.*, 2004): Die Phosphorylierung zytosolischer Serin- oder Threoninreste ist der erste Schritt und wird vermutlich durch eine Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht (Bukusoglu & Jenness, 1996). Es folgt die Ubiquitinierung, welche durch die sequentielle Wirkung von drei Enzymen (E1, E2 und E3) katalysiert wird und die kovalente Konjugation eines oder mehrerer Ubiquitin-Moleküle an Lysinreste des Zielproteins beinhaltet (Hicke & Riezman; 1996; Hicke, 1997). Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Protein von 8 kDa, dessen Konjugation eine reversible Proteinmodifikation, ähnlich der Phosphorylierung, darstellt (Chen & Sun, 2009). Von den elf E2/Ubc („ubiquitin conjugating enzyme“) Enzymen in *S. cerevisiae* ist mindestens ein Mitglied der Ubc1/Ubc4/Ubc5-Familie für die Ubiquitinierung einer großen Anzahl an Transportern und Rezeptoren verantwortlich, wohingegen nur eine spezifische E3-Ligase, Rsp5p, den letzten Schritt dieses Prozesses bei allen Plasmamembranproteinen ausführt (Hicke & Dunn, 2003). Im Unterschied zur Polyubiquitinierung über den Lysinrest 48, welche als Signal für die Proteindegradation durch das Proteasom dient, können die Monoubiquitinierung oder auch die Polyubiquitinierung über Lysin 63 die Proteintranslation, die DNA-Reparatur, den

Membrantransport aber auch die Endozytose beeinflussen (Hershko & Ciechanover, 1992; Staub & Rotin, 2006; Terrell *et al.*, 1998). Diese Modifikation wird vermutlich von Proteinen wie Ent1p oder Ede1p erkannt, welche die Rekrutierung des ubiquitinierten Rezeptors zu Endozytose-Stellen, gekennzeichnet durch Clathrin-Ansammlungen, vermitteln (Shih *et al.*, 2002; Toshima *et al.*, 2009). Zusätzlich zur Ubiquitinierung wurde das NPF_{X(1,2)}D-Peptid als Endozytose-Signal in *S. cerevisiae* beschrieben, welches bei Fusion die schnelle Internalisierung eines ansonsten stabilen Plasmamembranproteins bedingt. Dieser möglicherweise zur Ubiquitinierung redundante Mechanismus beruht auf einer Interaktion der Pan1-Komplex Komponente Sla1p mit dem NPF_{X(1,2)}D-Peptid (Tan *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2002).

Im zweiten Schritt der Endozytose wird durch Wachstum und Ausdehnung der Membran die Invagination weiter gefördert: An der positiven und negativen Regulierung der Aktinassemblierung sind mehr als die Hälfte der endozytotischen Proteine beteiligt (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003; Kaksonen *et al.*, 2006). Dazu zählen beispielsweise Vrp1p und Myo5p, ein Typ I Myosin-Motorprotein, die beide die Aktinassemblierung stimulieren. Die Einstülpung der Plasmamembran wird letztendlich durch die Aktinassemblierung und die Myosin-Motoraktivität vorangetrieben (Sun *et al.*, 2006). Viele Proteine sind an der Regulation der Organisation und dem „Turnover“ der Aktinfilamente beteiligt oder rekrutieren weitere regulatorische Proteine, wie Abp1p. Dazu gehören unter anderem die Aktin-bündelnden Proteine Scp1p und Sac6p, die „capping“ Proteine Cap1/2p und der Depolymerisationskomplex Aip1p/Cofilin (Kaksonen *et al.*, 2003; Gheorghe *et al.*, 2008; Huckaba *et al.*, 2004; Okreglak & Drubin, 2007).

Die anschließende Vesikelabschnürung wird in Säugerzellen durch die GTPase Dynamin katalysiert, deren Homolog in Hefe, Vps1p, eher eine Funktion bei der Membraneinstülpung innehat (Song & Schmid, 2003; Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2010). Der genaue Mechanismus der Vesikelabschnürung in *S. cerevisiae* wurde noch nicht aufgeklärt, dennoch scheint hierbei den Amphiphysin-Proteinen Rvs161p und Rvs167p eine entscheidende Rolle zuzukommen (Lombardi & Riezman, 2001; Kaksonen *et al.*, 2005).

Zeitgleich zur Vesikelablösung kommt es zu einem Abbau des „coat“ Moduls, was eine Voraussetzung zur Fusion mit dem Endosom darstellt. Darin sind die beiden Kinasen Ark1p und Prk1p involviert, welche durch Abp1p rekrutiert werden. Bekannte Substrate sind unter anderem Komponenten des Pan1-Komplexes, die durch Phosphorylierung das eingestülpte Vesikel verlassen (Smythe & Ayscough, 2003; Watson *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2001). Außerdem tragen Synaptojanin-Proteine, wie Inp52p, durch Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat zu einer Auflösung der „coat“-Strukturen bei (Stefan *et al.*, 2005; Toshima *et al.*, 2005).

Nach der Abschnürung und dem Abbau des „coat“-Gerüsts bewegt sich das Vesikel von der Plasmamembran weg und fusioniert mit dem frühen Endosom, wobei Geschwindigkeiten bis zu 250 nm/s erreicht werden (Robertson *et al.*, 2009). Dabei kann die Vesikelbewegung entlang von Aktin-Kabeln, gebündelten Aktinfilamenten, ablaufen (Huckaba *et al.*, 2004; Toshima *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann das Vesikel durch einen Kometen-ähnlichen Bewegungsablauf in das Zellinnere gelangen, der durch eine asymmetrische Aktinpolymerisation ausgelöst wird und in Analogie zur Bewegung von *Listeria monocytogenes* stattfindet (Lambrechts *et al.*, 2008).

Obwohl basierend auf „live cell imaging“ und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bereits ein schematisches Modell der Endozytose in *S. cerevisiae* erstellt werden konnte, fehlen weiterhin Details zu den beteiligten Mechanismen, der Ultrastruktur der endozytotischen Komplexe und dem exakten zeitlichen Ablauf. Erst durch deren Aufklärung kann das bestehende Modell vervollständigt werden (Toret & Drubin, 2006; Robertson *et al.*, 2009).

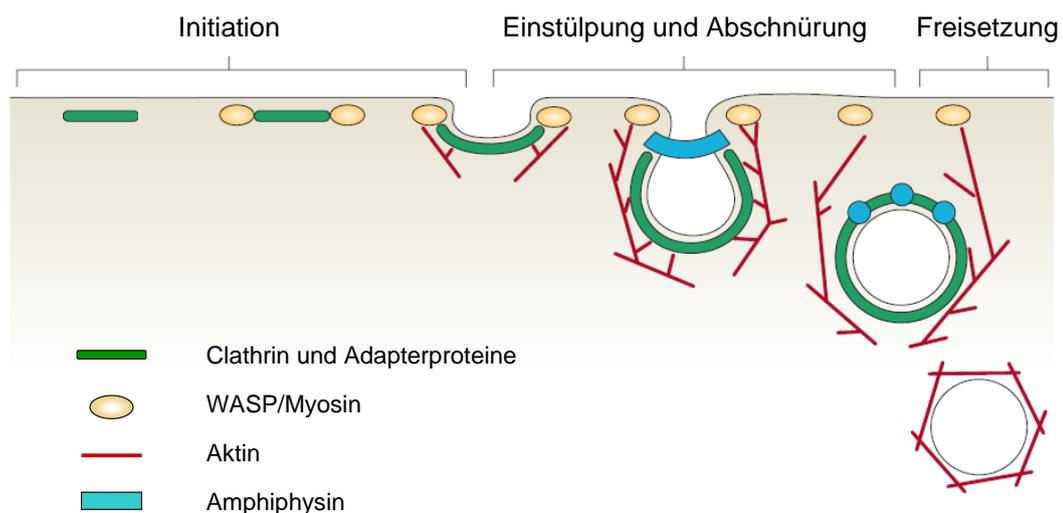


Abb. 3: Schematische Darstellung der Endozytose in *S. cerevisiae*. Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der endozytotischen Internalisierung, die Initiation, die Plasmamembran-Einstülpung, die Vesikelabschnürung und schließlich dessen Freisetzung. Die Komponenten der vier an der Endozytose in *S. cerevisiae* beteiligten Protein-Module unterliegen einem dynamischen Assemblierungs- und Disassemblierungsprozess (verändert nach Kaksonen *et al.*, 2006).

1.4. Der HDEL-Rezeptor Erd2p

Der Sekretionsweg besteht aus separaten Kompartimenten, die ihre Membranen und Proteine kontinuierlich durch eine geregelte Abfolge von Prozessen austauschen (Sallese *et al.*, 2009; Sallese *et al.*, 2006). Neu synthetisierte Proteine werden in das ER importiert und zum Golgi-Komplex transportiert, wo sie vor der Verteilung zu ihren Bestimmungsorten modifiziert werden (Beraud-Dufour & Balch; 2002). Die Retention von Proteinen mit C-terminalem HDEL-Motiv, wie die Chaperone Kar2p/BiP oder Pdi1p im ER-Lumen, basiert auf der HDEL-vermittelten Interaktion mit dem Rezeptor Erd2p im Golgi, so dass der Rezeptor/Liganden-Komplex retrograd durch COP I-beschichtete Vesikel das ER erreicht (Pelham *et al.*, 1988; Semenza *et al.*, 1990; Aoe *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002). Die Bindung eines Liganden an den HDEL-Rezeptor wird durch den pH-Wert beeinflusst: Der optimale pH-Wert für die Bindung liegt im schwach sauren Milieu des Golgi-Apparates. Wie unter Punkt 1.1.2 dargestellt, erfolgt im ER-Lumen aufgrund des neutralen pH-Werts eine Dissoziation des Komplexes, gefolgt von einem Recycling des Rezeptors, d. h. er gelangt über Vesikel zurück zum Golgi-Apparat (Wilson *et al.*, 1993). Das essentielle Protein Erd2p ist daher hauptsächlich in den Membranen des ER und Golgi sowie dem ERGIC („ER Golgi intermediate compartment“) lokalisiert (Semenza *et al.*, 1990; Huh *et al.*, 2003; Schuldiner *et al.*, 2005).

Während der Evolution hat sich das *ERD2*-Gen vervielfältigt, so dass in Säugerzellen drei Rezeptoren identifiziert werden konnten, welche HDEL/KDEL-ähnliche Signale mit unterschiedlicher Spezifität erkennen (Raykhel *et al.*, 2007). Homologe des HDEL-Rezeptors wurden bei einer Vielzahl anderer Spezies gefunden, darunter Hefen wie *Kluyveromyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe*, Protozoen wie *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* aber auch Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder Vertreter der Metazoen wie z. B. *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oder *Xenopus laevis* (Lewis *et al.*, 1990; Elmendorf & Haldar, 1993; Lee *et al.*, 1993; Pfluger *et al.*, 2005). Neben seiner Funktion in der Rückführung luminaler ER-Proteine scheint der Rezeptor auch an der Transportregulation im Sekretionsweg beteiligt zu sein: In *erd2*-Mutanten ist der Transport durch den Golgi-Apparat gestört und es kommt zu einer Akkumulation intrazellulärer Membranen (Semenza *et al.*, 1990). Die essentielle Bedeutung des *ERD2*-Genproduktes liegt jedoch wahrscheinlich in der Rückführung ER-residenter Proteine: Alle lebensfähigen *erd2*-Mutanten zeigten eine verminderte Retention HDEL-tragender Proteine. Bisher konnte allerdings kein Protein identifiziert werden, dessen HDEL-vermittelter Rücktransport in das ER essentiell ist. Sowohl die Expression von Kar2p als auch von Kre5p oder Pdi1p ohne C-terminales HDEL-Motiv führten nicht zu einem letalen Phänotyp, der sich ansonsten bei Deletion der entsprechenden Gene manifestiert (Hardwick *et al.*, 1990; Meaden *et al.*, 1990; LaMantia *et al.*, 1991). Townsley *et al.* (1994) folgerten aus dieser Beobachtung, dass die

essentielle Funktion von Erd2p in der HDEL-vermittelten ER-Retention mehrerer Proteine begründet sein muss. Im Gegensatz zur Hefe ist die Funktion des KDEL-Rezeptors in Säugerzellen intensiver analysiert worden: In transgenen Mäusen, die eine mutierte KDEL-Rezeptor-Variante exprimierten, konnten Defekte in der ER-Qualitätskontrolle nachgewiesen werden, was zur Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie führte (Hamada *et al.*, 2004). Eine detaillierte Untersuchung durch siRNA-vermittelten „knock-down“ des KDEL-Rezeptors ergab eine Funktion als „Signalling“-Rezeptor in der Golgi-SFK („Src family kinase“)-Kaskade und damit bei der Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichts des Golgi-Komplexes (Pulvirenti *et al.*, 2008). Der KDEL-Rezeptor scheint außerdem durch Induktion der Autophagie beim Abbau fehlgefalteter Proteine, welche neurodegenerative Krankheiten auslösen, beteiligt zu sein (Wang *et al.*, 2011).

In der Hefe *S. cerevisiae* konnte unlängst eine geringe Anzahl an Rezeptoren auch in der Plasmamembran nachgewiesen werden, wobei die Funktion dieser Kolokalisierung noch nicht bekannt ist (Punkt 1.1.2; Heiligenstein, 2008; Dausend, 2010). Das virale Killertoxin der Hefe *S. cerevisiae*, K28, nutzt diesen Umstand, um durch Interaktion des Toxin-eigenen C-terminalen HDEL-Signals mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran die Internalisierung in die Zielzelle zu vermitteln. Daher bietet sich die Untersuchung der K28-Aufnahme als ein geeigneter Indikator für die Plasmamembranlokalisierung sowie die Funktionsfähigkeit des Rezeptors Erd2p an. In diesem Zusammenhang war die Aufklärung der Erd2p-Topologie von besonderem Interesse, da diese eine Voraussetzung für die detaillierte Analyse der Rezeptor-Endozytose darstellt und unter anderem die Identifikation von Interaktionspartnern ermöglicht. Die Erd2p-Topologie stimmt mit der des bovinen KDEL-Rezeptor überein: Der HDEL-Rezeptor besitzt sechs Transmembrandomänen, wobei sowohl N- als auch C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind (Singh *et al.*, 1993; Dausend, 2010). In den zytoplasmatischen Bereichen ist sowohl ein NPFX_(1/2)D-ähnliches Motiv, NPFRILGD, als auch ein Lysincluster lokalisiert, deren Beteiligung an der K28-Endozytose bestätigt wurden (Dausend, 2010). Ersteres könnte durch Interaktion mit Epsinen oder Sla1p zu einer Verbindung des Rezeptors mit der Clathrin-Hülle oder dem Aktinnetzwerk beitragen. Das zweite Motiv, das Lysincluster im C-Terminus von Erd2p, scheint als Angriffspunkt für eine Ubiquitinierung ebenfalls die Endozytose des HDEL-Rezeptors zu beeinflussen, falls diese nach dem „PURE-Pathway“ abläuft. Das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc4p und die Ubiquitin-Ligase Rsp5p katalysieren diesen Schritt der K28/Erd2p-Endozytose, wobei eine Monoubiquitinierung vermutlich zur Internalisierung ausreicht (Heiligenstein *et al.*, 2006; Dausend, 2010). Die Bedeutung der Rezeptorubiquitinierung für die Endozytose eines A/B-Toxins wird auch am Beispiel des Anthrax-Toxins deutlich, dessen Internalisierung ebenfalls die (Mono)ubiquitinierung des Rezeptors voraussetzt (Abrami *et al.*, 2006; Abrami *et al.*, 2010).

1.5. Ziele und Fragestellung der Arbeit

A/B-Toxine können auf verschiedenen Wegen in die Zielzelle gelangen, wobei über die zugrunde liegenden Mechanismen bisher wenig bekannt ist. Als Mitglied der A/B-Toxin-Familie weist das *S. cerevisiae* Killertoxin K28 auffallende Ähnlichkeiten zu verschiedenen klinisch relevanten Toxinen auf, die von Pflanzen oder Bakterien hergestellt werden. Die Untersuchung des A/B-Toxin-Traffickings in einem genetisch leicht manipulierbaren Organismus wie der Hefe *S. cerevisiae* ermöglicht es, Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen A/B-Toxinen und zellulären Proteinen auch auf Säugerzellen zu übertragen. Im Fokus liegen dabei die K28-Endozytose und der retrograde Toxintransport, beides entscheidende Vorgänge zur Ausbildung der Toxinwirkung. Das Toxin K28 eignet sich zudem als Modell-Cargo, um die Komponenten und den Ablauf von essentiellen Prozessen wie der Endozytose näher charakterisieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die K28-Internalisierung und der intrazelluläre Transport sowie die Lokalisation und Funktion des Toxinrezeptors Erd2p an der Plasmamembran analysiert werden. Einen Schwerpunkt sollte die Visualisierung des Toxin-Traffickings in lebenden Zellen in Echtzeit durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter K28-Toxinvarianten bilden. Dazu sollte zunächst ein geeignetes Expressionssystem zur Herstellung von fluoreszierenden und biologisch aktiven K28-Derivaten etabliert werden. Diese K28-Chimären sollten ein „live cell imaging“ der Toxin-Internalisierung erlauben. Dabei sollte das K28-Trafficking unter anderem in Hefe-Deletionsmutanten mit Defekten in Endozytose und dem retrograden Transport vergleichend zum Wildtyp visualisiert werden. Die Behandlung von Säugerzellen mit fluoreszierenden K28-Varianten sollte Aufschluss über eine mögliche Aufnahme des viralen A/B-Toxins durch höhere eukaryotische Zellen geben.

Parallel dazu sollte die Kolokalisation des K28-Rezeptors Erd2p an der Plasmamembran fluoreszenzmikroskopisch bestätigt und die endozytotische Aufnahme einer fluoreszenzmarkierten HDEL-Rezeptorvariante nachgewiesen werden. Diese K28-Rezeptor-Variante sollte eine zweite Möglichkeit bieten, indirekt den Toxintransport in lebenden Hefezellen analysieren zu können. Die Untersuchung der Aufnahme eines natürlichen Liganden des HDEL-Rezeptors sollte die physiologische Funktion der Erd2p-Kolokalisation an der Plasmamembran bekräftigen.

Um den Mechanismus der K28/Erd2p-Endozytose und des retrograden Transports näher charakterisieren zu können, sollten aufbauend auf den Untersuchungen von Heiligenstein (2008) und Dausend (2010) weitere an diesen Prozessen beteiligte Proteine in einem Screen identifiziert werden. Neben der Relevanz des „PURE-Pathway“ für die Erd2p-Endozytose sollte zudem die Beteiligung weiterer Endozytose-Motive adressiert werden. Dazu sollte auch die Mobilitätsanalyse einer fluoreszenzmarkierten Erd2p-Variante unter verschiedenen Bedingungen beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1. Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Bakterienstämme sind in Tab. 2 aufgeführt. Zur Klonierung wurden elektrokompente TOP10- oder DH5 α -Zellen, zur AccepTorTM-Klonierung chemisch kompetente „Nova Blue Singles“ verwendet. Die heterologe Proteinexpression wurde in BL21(DE3) durchgeführt.

Tab. 2: *Escherichia coli*-Stämme, deren Genotypen und Referenzen.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Biomol Studier & Moffatt, 1986
DH5 α	F ⁻ , λ ⁻ , recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, deoR, Δ (argF-LacZYA9, U196, ϕ 80 lacZ Δ M15)	Pharmacia Grant <i>et al.</i> , 1990
NovaBlue Singles	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15::Tn 10] (Tet ^R)	Novagen
Top 10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen
Top 10 F'	F' {lacI ^q Tn10 (Tet ^r)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen

2.1.2. Hefen

Tab. 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme. Deletionsstämme der Firma „Open Biosystems“ sind in Tab. 4 dargestellt. Die zur heterologen Proteinexpression verwendeten *Pichia pastoris*- und *Kluyveromyces lactis*-Stämme sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 3: *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme, deren Genotypen und Referenzen.

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
192.2d	<i>MATα ura3 leu2</i>	Schmitt <i>et al.</i> , 1996
BiFc Sis Positivkontrolle	S86c mit den Plasmiden pRS315 Sis1 MNc und pRS316 Sis1 MCc	Schäuble, 2008
BY4741	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Open Biosystems
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
LRB759	<i>MATα his3 leu2 ura3-52</i>	L. C. Robinson Babu <i>et al.</i> , 2002
LRB951	<i>MATα his3 leu2 ura3-52 yck1-Δ1 ::ura3 yck2-2ts</i>	L. C. Robinson Babu <i>et al.</i> , 2002
MDY581	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 yap1801Δ::KAN yap1802Δ::HPH</i>	E. Conibear Burston <i>et al.</i> , 2009
MS300b	K28-Superkiller	M. Schmitt
rsy255	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112</i>	R. Schekman
RSY475	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 kar2-159</i>	R. Schekman
S86c	<i>MATα ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1</i>	M. Schmitt
SEY6210	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
YA Erd2	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2	Dausend, 2010
YA Erd2 ANEA	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2-ANEA	Diese Arbeit
YA Erd2 K/R	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2 K/R	Dausend, 2010
YA Erd2 K/R Ubiquitin	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2 K/R Ubiquitin	Diese Arbeit
YA Erd2 K/R ₂₀₈	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2 K/R ₂₀₈	Diese Arbeit
YA Erd2 K/R ₂₁₃	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2 K/R ₂₁₃	Diese Arbeit
YA Erd2 K/R ₂₁₆	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2 K/R ₂₁₆	Diese Arbeit
YA Erd2 K/R ₂₁₉	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pESC-LEU Erd2 K/R ₂₁₉	Diese Arbeit
YA12	<i>MATα ade2 ade3 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 TRP1 erd2-Nco</i> mit Plasmid pYA12 (2 μ URA3 ADE3 SEC12)	H. Pelham, Semenza <i>et al.</i> , 1990

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
YA12 Erd2ΔC	YA12 mit den Plasmiden pYA12 (2μ URA3 ADE3 SEC12) und pJD.1 ERD2-C (pESC-LEU mit Promotor P _{GAL1} , ERD2-Variante mit einer Deletion der letzten 39 bp (Deletion des C-Terminus bis zur letzten potentiellen Transmembrandomäne) CYC1-Terminator)	Dausend, 2010
YBL040c GFPclone	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ERD2::ERD2GFP HIS3MX</i>	Invitrogen Huh et al., 2003
YOL062 cGFPclone	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 APM4::APM4GFP HIS3MX</i>	Invitrogen Huh et al., 2003

Tab. 4: Hefe-Deletionsmutanten. Die *S. cerevisiae* Stämme wurden von der Firma „Open Biosystems“ bezogen (Wildtyp zu den Deletionsmutanten: *S. cerevisiae* BY4742).

ORF	Deletiertes Gen
YAL002W	<i>VPS8</i>
YBL007C	<i>SLA1</i>
YBL037W	<i>APL3</i>
YBR005W	<i>RCR1</i>
YBR290W	<i>BSD2</i>
YCL034W	<i>LSB5</i>
YCR030C	<i>SYP1</i>
YDL113C	<i>SNX42</i>
YDL146W	<i>LDB17</i>
YDR129C	<i>SAC6</i>
YDR173C	<i>VPS4</i>
YDR313C	<i>PIB1</i>
YDR388W	<i>RVS167</i>
YDR425W	<i>SNX41</i>
YDR495C	<i>VPS3</i>
YFR024C	<i>LSB3</i>
YGL167C	<i>PMR1</i>
YGL181W	<i>GTS1</i>

ORF	Deletiertes Gen
YGL206C	<i>CHC1</i>
YGR080W	<i>TWF1</i>
YGR086C	<i>PIL1</i>
YGR261C	<i>APL6</i>
YHR016C	<i>YSC84</i>
YHR114W	<i>BZZ1</i>
YHR181W	<i>SVP26</i>
YIL024C	<i>CAP2</i>
YIL064W	<i>SEE1</i>
YIL095W	<i>PRK1</i>
YIR003W	<i>AIM21</i>
YIR033W	<i>MGA2</i>
YJL020C	<i>BBC1</i>
YJL036W	<i>SNX4</i>
YJR005W	<i>APL1</i>
YJR058C	<i>APS2</i>
YKL007W	<i>CAP1</i>
YKL135C	<i>APL2</i>

ORF	Deletiertes Gen
YLR262C	<i>YPT6</i>
YLR392C	<i>ART10</i>
YLR419W	<i>CRN1</i>
YML008C	<i>ERG6</i>
YML097C	<i>VPS9</i>
YML111W	<i>BUL2</i>
YMR092C	<i>AIP1</i>
YMR171C	<i>EAR1</i>
YMR274C	<i>RCE1</i>
YMR275C	<i>BUL1</i>

ORF	Deletiertes Gen
YNL020C	<i>ARK1</i>
YNL084C	<i>END3</i>
YNL106C	<i>INP52</i>
YOL062C	<i>APM4</i>
YOR036W	<i>PEP12</i>
YOR089C	<i>VPS21</i>
YOR124C	<i>UBP2</i>
YOR357C	<i>SNX3</i>
YPL084W	<i>BRO1</i>

Tab. 5: Verwendete *K. lactis* und *P. pastoris* Stämme zur heterologen Proteinexpression.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>K. lactis</i> GG799	Keine Auxotrophien oder genetische Marker	New England Biolabs
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i> (Phänotyp: Mut ⁺)	Invitrogen
<i>P. pastoris</i> KM71	<i>arg4 his4 aox1: ARG4</i> (Phänotyp: Mut ^S ; Arg ⁺)	Invitrogen

2.1.3. Säugerzellen

Zur Inkubation mit verschiedenen K28-Varianten wurden HeLa-Zellen, eine immortale epithelähnliche Zelllinie aus einem humanen Zervixkarzinom, verwendet.

2.2. Nährmedien

Die Substanzen zur Herstellung der Nährmedien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien und Hefen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, in H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Flüssigmedien wurden bei Raumtemperatur, Agarplatten bei 4 °C gelagert.

2.2.1. Bakterien

LB-Medium („lysogeny broth medium“)

Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
Natriumchlorid	0,5 %
Agar zur Herstellung von festem Medium	1,5 %

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg/ml
in 50 % Ethanol	

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25 mg/ml
-----------	----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal	20 mg/ml
in Dimethylformamid	

Die Lösung wurde im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung

IPTG	100 mM
------	--------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2. Hefen

Die folgenden Nährmedien eignen sich zur Kultivierung von *K. lactis*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae*. B-Medium wurde ausschließlich zur Proteinexpression in *K. lactis* und *S. cerevisiae* verwendet. Medien zur Proteinexpression in *P. pastoris* sind gesondert aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien durch Autoklavieren sterilisiert.

YPD-Medium („yeast extract peptone dextrose medium“)

Glukose	2,0 %
Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	1,0 %
Agar zur Herstellung von festem Medium	1,5 %

Die Glukose-Lösung wurde getrennt autoklaviert.

YPG- Medium („yeast extract peptone galaktose medium“)

Galaktose	3,0 %
Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	1,0 %
Agar zur Herstellung von festem Medium	1,5 %

Die Galaktose-Lösung wurde getrennt autoklaviert.

Synthetisches Medium

Lösung A

Aminosäure-Mix	0,8 g/l
Amoniumsulfat	5,0 g/l

Lösung B

Yeast nitrogen base	1,7 g/l
---------------------	---------

Lösung C

Glukose oder Raffinose	20 g/l
oder Galaktose	30 g/l
Agar zur Herstellung von festem Medium	15 g/l

Die Lösungen A und C wurden getrennt autoklaviert, die Lösung B sterilfiltriert. Anschließend wurden die Lösungen gemischt. Zur Herstellung von 5-FOA-Agar wurde das Medium in doppelter Konzentration hergestellt und mit sterilfiltrierter 0,2%iger 5-Fluororotsäure-Stammlösung im Verhältnis 1 : 1 gemischt, so dass eine 5-FOA-Endkonzentration von 0,1 % erreicht wurde.

10x Aminosäure-Mix

Adenin	2,5 g
Arginin	1,2 g
Aspartat	6,0 g
Glutamat	6,0 g
Histidin	1,2 g
Leucin	3,6 g
Lysin	1,8 g
Methionin	1,2 g
Phenylalanin	3,0 g
Serin	22,5 g
Threonin	12,0 g
Thyrosin	1,8 g
Tryptophan	1,2 g
Valin	9,0 g
Uracil	1,2 g

Zur Herstellung von drop-out-Lösungen wurden die entsprechenden Aminosäuren bzw. Basen ausgelassen.

B-Medium

Galaktose	30,00 g/l
oder Glukose	20,00 g/l
Malat	20,00 g/l
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,05 g/l
Ammoniumsulfat	1,50 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	1,00 g/l
Calciumchlorid	0,50 g/l
Trinatriumcitrat	0,50 g/l
Inosit	0,04 g/l
Aminosäure-Mix	0,80 g/l
100x Vitamin-Stammlösung	10 %
100x Spurenelement-Stammlösung	10 %

Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid-Plätzchen auf 4,7 eingestellt. Die Galaktose-Lösung und die Aminosäure-Lösung wurden getrennt autoklaviert. Zur Komplettierung des Mediums wurden die Vitamin- und Spurenelement-Lösung nach dem Autoklavieren zugegeben.

100x Vitamin-Stammlösung

4-Aminobenzoessäure	20 mg/l
Biotin	20 mg/l
Folsäure	20 mg/l
Nikotinsäure	100 mg/l
Riboflavin	50 mg/l
Thiaminiumchlorid	50 mg/l
Calcium-D-Panhotenat	100 mg/l

Die Lösung wurde 20 min in strömendem Dampf sterilisiert und bei -20 °C gelagert.

100x Spurenelement-Stammlösung

Borsäure	0,2 g/l
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	0,2 g/l
Zinksulfat-Heptahydrat	0,2 g/l
Aluminiumchlorid	0,2 g/l
Kupfersulfat-Pentahydrat	0,1 g/l
Natriummolybdat-Dihydrat	0,1 g/l
Lithiumsulfat-Monohydrat	0,1 g/l
Kaliumiodid	0,1 g/l
Kalium-Hydrogentartrat	2,0 g/l

Medien zur Proteinexpression in *P. pastoris*BMG-Medium („buffered minimal glycerin medium“)

1 M Puffer-Stammlösung	10 %
YNB	1,34 %
Biotin	0,00004 %
Glyzerin	1 %
Ammoniumsulfat	1 %

Das Glyzerin wurde mit der entsprechenden Menge H₂O dest. autoklaviert. YNB zusammen mit Ammoniumsulfat wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen zugegeben, ebenso die Biotin-Stammlösung. Die entsprechende Puffer-Stammlösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugefügt.

BMM-Medium („buffered minimal methanol medium“)

1 M Puffer-Stammlösung	10 %
YNB	1,34 %
Biotin	0,00004 %
Methanol	0,5 %
Ammoniumsulfat	1 %
(„casamionacids“)	1 %

Zu der entsprechenden Menge autoklaviertem H₂O dest. wurden sterilfiltriertes YNB mit Ammoniumsulfat sowie Biotin-Stammlösung gegeben. Das Medium wurde unmittelbar vor Gebrauch mit der gewünschten Puffer-Stammlösung, Methanol und eventuell „casaminoacids“-Stammlösung komplettiert.

500x Biotin-Stammlösung

Biotin	0,2 g/l
--------	---------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

„Casaminoacids“-Stammlösung

„Casamionacids“	0,33 g/ml
-----------------	-----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

1 M Natriumcitratpuffer pH 4,7

Zitronensäure-Monohydrat	70 g/l
Trinatriumcitrat	140 g/l

1 M Natriumphosphatpuffer pH 7

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	60,5 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	108,9 g/l

1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6

Kaliumdihydrogenphosphat	118,1 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat	23,0 g/l

1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7

Kaliumdihydrogenphosphat	106,1 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat	212,3 g/l

2.3. Kultivierungsbedingungen

2.3.1. *Escherichia coli*

LB-Flüssigkulturen von *E. coli* wurden bei 37 °C auf einem Schüttler (220 rpm) inkubiert, LB-Agar-Platten im Brutschrank bei 37 °C. Zur Selektion der *E. coli*-Stämme wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum abhängig vom enthaltenen Plasmid zugefügt (Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml bzw. Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/ml). Zur Blau-weiß-Selektion bei Klonierung in den Vektor pCRII-TOPO wurden zusätzlich pro Platte 40 µl X-Gal-Lösung ausplattiert. Wurde der Vektor pSTBlue-1 zur Klonierung verwendet, wurden außerdem 20 µl IPTG-Lösung zugegeben.

Die Expression von Kar2p (im Plasmid pET24a(+)) im Stamm BL21(DE3) wurde nach einem Protokoll von Corsi und Schekman (1997) durchgeführt. Der Stamm BL21(DE3) exprimiert die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Die Transkription des Zielgens im Vektor pET kann somit durch die T7-RNA-Polymerase, welche an den T7-Promotor bindet, erfolgen (Moffatt & Studier, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990). Bereits wenige Stunden nach der Induktion kann die Menge des heterologen Proteins bis zu 50 % des Gesamtproteins der Zelle betragen.

500 ml LB-Medium wurden mit 625 µl Kanamycin-Lösung versetzt und mit 5 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 28 °C und 220 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach weiteren 2,5 h Inkubation bei 28 °C und 220 rpm wurden die Zellen geerntet (10 min, 8.000 rpm, 4 °C), das Pellet mit 50 ml H₂O dest. gewaschen und bei -20 °C gelagert.

2.3.2. *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis*

Die Hefen wurden in YPD bzw. YPG Komplexmedium oder entsprechendem d/o-Flüssigmedium bei 30 °C auf einem Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Zur Proteinexpression oder Fluoreszenzmikroskopie wurden die Kulturbedingungen hinsichtlich Temperatur und Schüttelrate variiert. Agarplatten wurden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.3. *Pichia pastoris*

Die Kultivierung untransformierter Zellen erfolgte in YPD-Komplex-Medium bei 30 °C und 220 rpm auf einem Inkubationsschüttler. His-d/o-Agarplattchen zur Selektion transformierter Zellen wurden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Positive Klone wurden zunächst in his-d/o-Medium angezogen. Die Kultur diente zum Animpfen der Hauptkultur in BMG-Medium im Erlenmeyerkolben. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach mindestens 24 h durch Shiften der Kultur auf methanolhaltiges BMM-Medium. Dazu wurden die Zellen bei 9.000 rpm 10 min abzentrifugiert und in BMM-Medium aufgenommen. Die Induktion der Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 % Methanol ein- oder zweimal täglich aufrechterhalten. Die Temperatur, Kultivierungsdauer und Schüttelrate wurden während der Induktion zur Optimierung der Proteinexpression variiert.

2.3.4. Kryokulturen

Zur langfristigen Lagerung von Hefe- und Bakterienstämmen wurden Kryokulturen hergestellt, welche bei -80 °C gelagert werden können. Dazu wurden 1 ml einer frischen Übernacht-Kultur mit 1 ml sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.3.5. HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Das kommerziell erhältliche DMEM-Medium wurde mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum komplettiert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS („phosphate buffered saline“) gewaschen. Durch die Zugabe von 2 ml 0,5%iger Trypsin/EDTA-Lösung und zweiminütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abgelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 8 ml vorgewärmtem serumhaltigem Medium gestoppt. Ein Aliquot der Suspension wurde in eine neue Zellkulturflasche übernommen und mit frischem Medium aufgefüllt. Für weitere Versuche wurden die Zellen nach Bestimmung der Zellzahl (Punkt 2.7.1) in Multiwell-Platten überführt. Alle verwendeten Medien und Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in den folgenden Tabellen aufgeführt: Tab. 6 gibt einen Überblick über die als PCR-Template oder zu Sequenzierungszwecken eingesetzten Vektoren. Plasmide zur Proteinexpression sind in Tab. 7 zusammengestellt. Schematische Darstellungen der Grundvektoren zur Zwischenklonierung und Proteinexpression sind in den Abb. 4 - 9 zu finden.

Tab. 6: Grundvektoren zur Sequenzierung, Zwischenklonierung oder zur DNA-Amplifikation, deren Eigenschaften, Marker und Herkunft.

Plasmid	Verwendung	Eigenschaften/Marker	Herkunft/Referenz
pCRII-TOPO	Sequenzierung	TOPO-Cloning site, <i>LacZα</i> -Gen zur Blau-weiß-Selektion, Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz-Gene, pUC origin	Invitrogen
pYES2.1/V5-His-TOPO	Sequenzierung	TOPO-Cloning-site, <i>GAL1</i> -Promotor, pUC origin, 2 μ origin, f1 origin, Ampicillin-Resistenz-Gen, <i>URA3</i> -Marker	Invitrogen
pSTBlue-1	Sequenzierung	Multiple cloning region, <i>LacZα</i> -Gen zur Blau-weiß-Selektion, pUC origin, Kanamycin-Resistenz-Gen, Ampicillin-Resistenz-Gen	Novagen
pPGK-M28-1	Template für K28	pDT-PGK mit <i>XhoI/BglII</i> Fragment, enthält K28 ORF	M. Schmitt, Schmitt & Tipper, 1995
pmCherry-N1	Template für mCherry	Säuger-Expressions-Vektor, PCMV IE, mCherry-ORF, pUC ori, SV40 Poly A+, HSV TK Poly A+, f1 ori, PSV40, Kanamycin-Resistenz-Gen, Neomycin-Resistenz-Gen, SV40 ori,	P. Lipp
pUL28 Deg1-GFP	Template für yEGFP	Abgeleitet von pRS314 (<i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , <i>lacZ</i> , f1(+), ori, <i>TRP1</i> -Marker, Ampicillin-Resistenz-Gen; Sikorski. & Hieter, 1988) mit einkloniertem <i>CUP1</i> -Promotor, Deg-1, <i>yEGFP</i> -Gen, <i>CYC1</i> -Terminator	T. Sommer, Lenk & Sommer, 2000
NPY-mTFP	Template für mTFP	Kanamycin-Resistenz-Gen	J. Rettig
pYSCE	Template für Erd2	<i>ERD2</i> -Gen, Ampicillin-Resistenz-Gen und <i>LEU2</i> -Marker	H. Pelham
pSM 1916	Template für Ubiquitin (no lys)-G75 Δ , G76 Δ	2 μ , <i>URA3</i> -Marker, Ampicillin-Resistenz-Gen, <i>STE6</i> -GFP-Ub-(no lys)-G75 Δ , G76 Δ	S. Michaelis, Kelm <i>et al.</i> , 2004

Tab. 7: Plasmide zur Proteinexpression. Grundvektoren und im Rahmen dieser Arbeit erstellte Expressionsvektoren deren Eigenschaften, Marker und Herkunft

Plasmid	Eigenschaften/Marker	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
pET24a(+)	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor, Kanamycin-Resistenz-Gen, T7-Tag-Sequenz, His-Tag-Sequenz, T7-Promotor	Novagen
pET HisKar2 ^{HDEL}	KAR2 ohne Signalsequenz, mit N-terminalem His-Tag und C-terminalem HDEL-Signal in pET (<i>NdeI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pET HisKar2 ^Δ	KAR2 ohne Signalsequenz, mit N-terminalem His-Tag, ohne C-terminales HDEL-Signal in pET (<i>NdeI/NotI</i>)	Diese Arbeit
<i>K. lactis</i>		
pKLAC	<i>K. lactis</i> Expressionsvektor zur genomischen Integration Ampicillin-Resistenz-Gen, αMF-Sekretionssignal, <i>amdS</i> , <i>LAC4-PBI</i> -Promotor	New England Biolabs
pKLAC K28-mCherry ^{HDEL}	proK28mCherry ^{HDEL^R} in pKLAC (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLAC K28-mCherry ^Δ	proK28mCherry ^Δ in pKLAC (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLAC β-mCherry ^{HDEL}	proβmCherry ^{HDEL^R} in pKLAC (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLAC K28-GFP ^{HDEL}	proK28GFP ^{HDEL^R} in pKLAC (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLAC β-GFP ^{HDEL}	proβGFP ^{HDEL^R} in pKLAC (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLAC K28-GFP ^Δ	proK28GFP ^Δ in pKLAC (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLACpptoX-FLAG/His	<i>HindIII/XhoI</i> -präproK28FLAGHis- <i>BglII</i> in pKLAC (<i>HindIII/BglII</i>)	Guida, 2007
pKLAC Kar2 ^{HDEL}	Kar2 ^{HDEL^R} mit nativem Sekretionssignal in pKLAC pptoX-FLAG/His (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pKLAC Kar2 ^Δ	Kar2 ^Δ mit nativem Sekretionssignal in pKLAC pptoXFlagHis (<i>XhoI/NotI</i>)	Diese Arbeit
<i>P. pastoris</i>		
pPIC3.5	<i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor zur genomischen Integration, <i>AOX1</i> -Promotor, Ampicillin-Resistenz-Gen, <i>HIS4</i> -Marker	Invitrogen
pPIC3.5-K28	präproK28 mit nativem Sekretionssignal in pPIC3.5	Eiden-Plach <i>et al.</i> , 2004
pPIC3.5 K28-mCherry ^{HDEL}	präproK28-mCherry ^{HDEL^R} mit nativem Sekretionssignal in pPIC3.5 (<i>EcoRI/NotI</i>)	Diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften/Marker	Herkunft/Referenz
pPIC3.5 Kar2 ^{HDEL}	<i>KAR2</i> ^{HDELK} mit nativem Sekretionssignal in pPIC3.5 (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC3.5 Kar2 ^Δ	<i>KAR2</i> ^Δ mit nativem Sekretionssignal in pPIC3.5 (<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9	<i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor zur genomischen Integration, <i>AOX1</i> -Promotor, αMF-Sekretionssignal, Ampicillin-Resistenz-Gen, <i>HIS4</i> -Marker	Invitrogen
pPIC9 K28-mCherry ^{HDEL}	proK28mCherry ^{HDELK} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 K28-mCherry ^Δ	proK28mCherry ^Δ in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 β-mCherry ^{HDELR}	proβmCherry ^{HDELR} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 mCherry ^{HDEL}	mCherry ^{HDELK} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 mCherry ^Δ	mCherry in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 K28-mTFP ^{HDEL}	proK28mTFP ^{HDELK} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 mTFP ^{HDEL}	mTFP ^{HDELK} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 K28-GFP ^{HDEL}	proK28GFP ^{HDELK} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 K28-GFP ^Δ	proK28GFP ^Δ in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
pPIC9 β-GFP ^{HDEL}	proβGFP ^{HDELK} in pPIC9 (<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I)	Diese Arbeit
<i>S. cerevisiae</i>		
pRS313	<i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , <i>HIS3</i> -Marker, ori, f1 origin, lacZ, Ampicillin-Resistenz-Gen	Sikorski & Hieter, 1989
pRS313 SLA1	<i>SLA1</i> unter Kontrolle des endogenen Promotors in pRS313	G. Payne, Howard <i>et al.</i> , 2002
pRS313 sla1Δshd1	<i>Sla1Δshd1</i> (Deletion der Sla homology domain 1, SHD1) unter Kontrolle des endogenen Promotors in pRS313	G. Payne Howard <i>et al.</i> , 2002
pRS315	<i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , <i>LEU2</i> -Marker, ori, f1 origin, lacZ, Ampicillin-Resistenz-Gen	Sikorski & Hieter, 1989
pRS315_mCherry	pRS315 mit Promotor P _{GAL1} , mCherry, <i>CYC1</i> -Terminator	Sevrieva, 2009
pRS315 Apm4-mCherry	<i>APM4</i> ohne Stopp-Codon in pRS315_mCherry (<i>Xho</i> I/ <i>Spe</i> I)	Diese Arbeit
pRS316	<i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , <i>URA3</i> -Marker, ori, f1 origin, lacZ, Ampicillin-Resistenz-Gen	Sikorski & Hieter, 1989

Plasmid	Eigenschaften/Marker	Herkunft/Referenz
pRS316 Erd2.657 Reporter	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> ohne Stopp-Codon, <i>V5-SUC2A-HIS3</i> -Reportersystem, <i>CYC1</i> -Terminator	Gießelmann, 2007
pRS316 Erd2-GFP	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> ohne Stopp-Codon, mit C-terminaler yEGFP-Fusion, <i>CYC1</i> -Terminator	Dausend, 2010
pRS316 Erd2 K/R-GFP	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> ohne Stopp-Codon, Mutation der Lysine 208, 213, 216 und 219 zu Arginin, C-terminale yEGFP-Fusion, <i>CYC1</i> -Terminator	Dausend, 2010
pRS316 Erd2-mCherry	<i>ERD2</i> ohne Stopp-Codon in pRS316 Erd2.657 Reporter (<i>XbaI/BamHI</i>)	Diese Arbeit
pYES Erd2.657	pYES mit <i>ERD2</i> ohne Stopp-Codon	Gießelmann, 2007
pYES Erd2.546	pYES mit <i>ERD2</i> verkürzt um eine Transmembrandomäne, ohne Stopp-Codon	Gießelmann, 2007
pYES Erd2.363	pYES mit <i>ERD2</i> verkürzt um drei Transmembrandomänen, ohne Stopp-Codon	Gießelmann, 2007
pRS316 Snc1-SNAP	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , Snc1-SNAP-Tag Fusion, <i>CYC1</i> -Terminator	Klein, 2009
pRS316 Erd2.657-SNAP	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> (<i>EcoRI/XbaI</i>)-SNAP-Tag Fusion, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pRS316 Erd2.546-SNAP	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , Erd2.564 (verkürzt um eine Transmembrandomäne)-SNAP-Tag Fusion, <i>CYC1</i> -Terminator	Klein, 2009
pRS316 Erd2.363-SNAP	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , Erd2.363 (<i>EcoRI/XbaI</i> , verkürzt um drei Transmembrandomänen)-SNAP-Tag Fusion, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pRS316 MCc	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , ORF des c-terminalen Teils von mCherry (234 bp) mit Stopp-Codon und Linker, <i>CYC1</i> -Terminator	Schäuble, 2008
pRS315 MNc	pRS315 mit Promotor P _{GAL1} , ORF des N-terminalen Teils von mCherry (477 bp) mit Stopp-Codon und Linker, <i>CYC1</i> -Terminator	Schäuble, 2008
pRS315 MNn	pRS315 mit Promotor P _{GAL1} , ORF des N-terminalen Teils von mCherry (477 bp) mit Linker, <i>CYC1</i> -Terminator	Schäuble, 2008
pRS316 MCn	pRS316 mit Promotor P _{GAL1} , ORF des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp) mit Linker, <i>CYC1</i> -Terminator	Schäuble, 2008
pRS315 MNc Erd2	pRS315 MNc mit <i>ERD2</i> ohne Stopp-Codon (<i>XhoI/XbaI</i>)	Schäuble, 2008

Plasmid	Eigenschaften/Marker	Herkunft/Referenz
pRS316 MCc Erd2	pRS316 MCc mit <i>ERD2</i> aus pYES ERD2.657 (<i>Sall/XhoI/XbaI</i>)	Diese Arbeit
pRS316 MCc Apm4	pRS316 MCc mit <i>APM4</i> ohne Stopp-Codon (<i>Sall/Paul</i>)	Diese Arbeit
pRS316 MCn Apm4	pRS316 MCn mit <i>APM4</i> mit Stopp-Codon (<i>Sall/Paul</i>)	Diese Arbeit
pRS315 MNn Apm4	pRS315 MNn mit <i>APM4</i> mit Stopp-Codon (<i>Sall/Paul</i>)	Diese Arbeit
pRS315 MNc Apm4	pRS315 MNc mit <i>APM4</i> ohne Stopp-Codon (<i>Sall/Paul</i>)	Diese Arbeit
pESC-LEU	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsvektor (7,8 kb), pUC origin, 2 μ origin, f 1 origin, <i>LEU2</i> -Marker, Ampicillin-Resistenz-Gen	Stratagene
pESC-LEU Erd2 ANEA	pESC-LEU mit mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> mit Austausch von Tyrosin 90 und Methionin 93 durch Alanin, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2 K/R ₂₀₈	pESC-LEU mit mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> - Variante, deren Lysin 208 durch Arginin ersetzt wurde, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2 K/R ₂₁₃	pESC-LEU mit mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> - Variante, deren Lysin 213 durch Arginin ersetzt wurde, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2 K/R ₂₁₆	pESC-LEU mit mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> - Variante, deren Lysin 216 durch Arginin ersetzt wurde, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2 K/R ₂₁₉	pESC-LEU mit mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> - Variante, deren Lysin 219 durch Arginin ersetzt wurde, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit
pESC-LEU Erd2 K/R Ubiquitin	pESC-LEU mit mit Promotor P _{GAL1} , <i>ERD2</i> – Ubiquitin (no lys-G75 Δ , G76 Δ)-Fusion, deren Lysine durch Arginin ersetzt wurden, <i>CYC1</i> -Terminator	Diese Arbeit

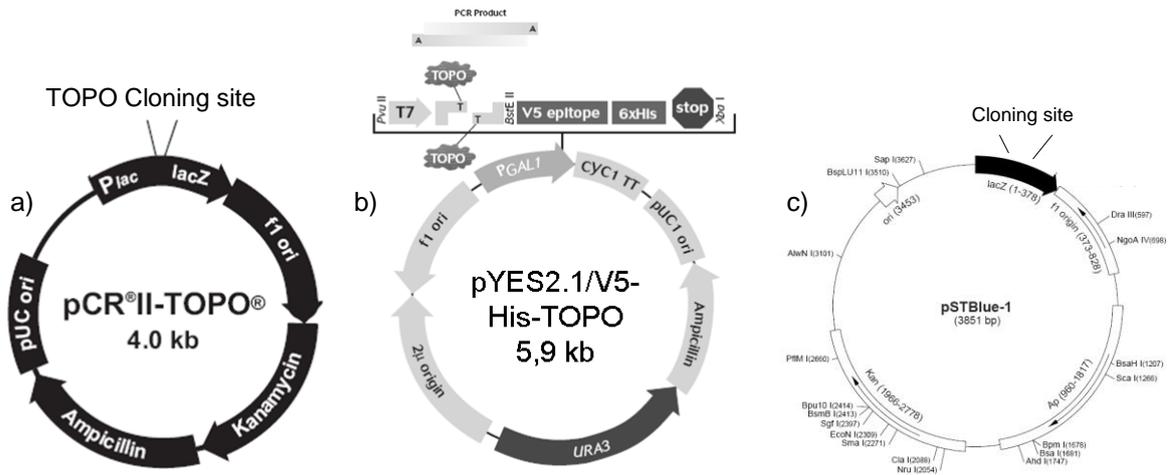


Abb. 4: Vektorkarten der Plasmide pCRII-TOPO, pYES2.1 und pST-Blue-1 zur Zwischenklonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten. Die Plasmide liegen linearisiert mit 3' dU- bzw. dT-Überhängen vor und ermöglichen daher die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit 3' dA-Überhängen, welche durch die *Taq*-Polymerase angefügt wurden. Die Plasmide pCRII-TOPO (a, Invitrogen) und pSTBlue-1 (c, Novagen) enthalten Antibiotika-Resistenz-Gene zur Selektion auf Ampicillin oder Kanamycin. Die Selektion der pYES-Plasmid (b, Invitrogen) -tragenden Transformanten erfolgt auf Ampicillin. Zur Sequenzierung wurden die kommerziell erhältlichen Primer SP6 und T7 für pCRII, SP6, M13FP, T7, RPC für pSTBlue-1 und GAL1for sowie V5rev für pYES verwendet.

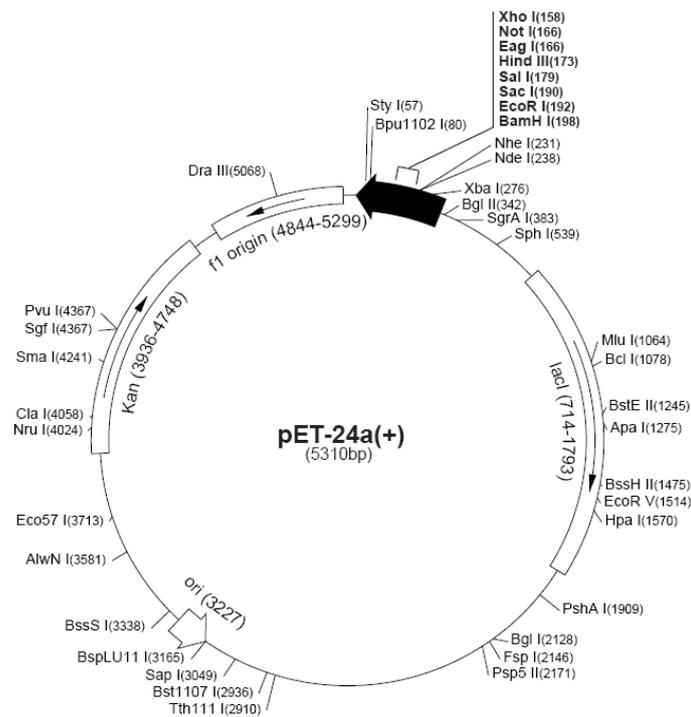


Abb. 5: Vektorkarte des *E. coli*-Expressionsvektors pET-24a(+). Der Vektor pET-24a(+) enthält ein Kanamycin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli*. Konstrukte zur Expression in *E. coli* wurden über *Nde*I/*Not*I-Restriktion in den Vektor eingebracht. Zur Proteinexpression wurde das Plasmid in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert, welcher die zur Transkription des Zielgens notwendige T7-RNA Polymerase unter einem IPTG-induzierbaren Promotor enthält (Novagen).

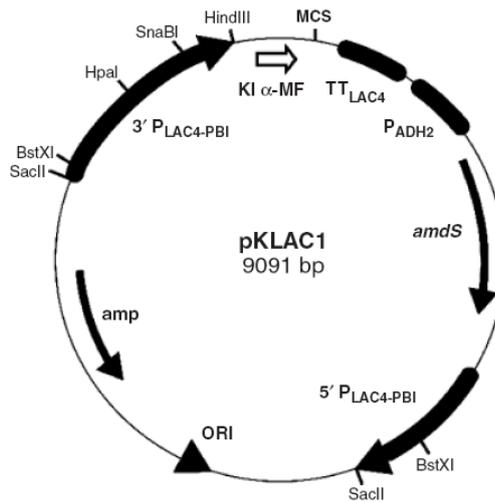


Abb. 6: Vektorkarte des *K. lactis*-Expressionsvektors pKLAC1. Der *K. lactis* Expressionsvektor enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli*. Nach SacI-Restriktion kann die Expressionskassette in das Genom von *K. lactis* in die Promotorregion des *LAC4*-Lokus integriert werden. Diese enthält das Acetamidase-Gen (*amdS*) zur Selektion auf Acetamid-haltigem Medium ohne weitere Stickstoffquelle. Das Sekretionssignal des α -Mating-Faktors ermöglicht eine effiziente Sekretion des exprimierten Proteins. Die Konstrukte wurden über *XhoI/NotI*-Restriktion in den Vektor eingebracht. Zur Abspaltung des Sekretionssignals wurde eine Kex2p-Schnittstelle in den 5'-Bereich des Konstrukts eingebracht (van Ooyen *et al.*, 2006).

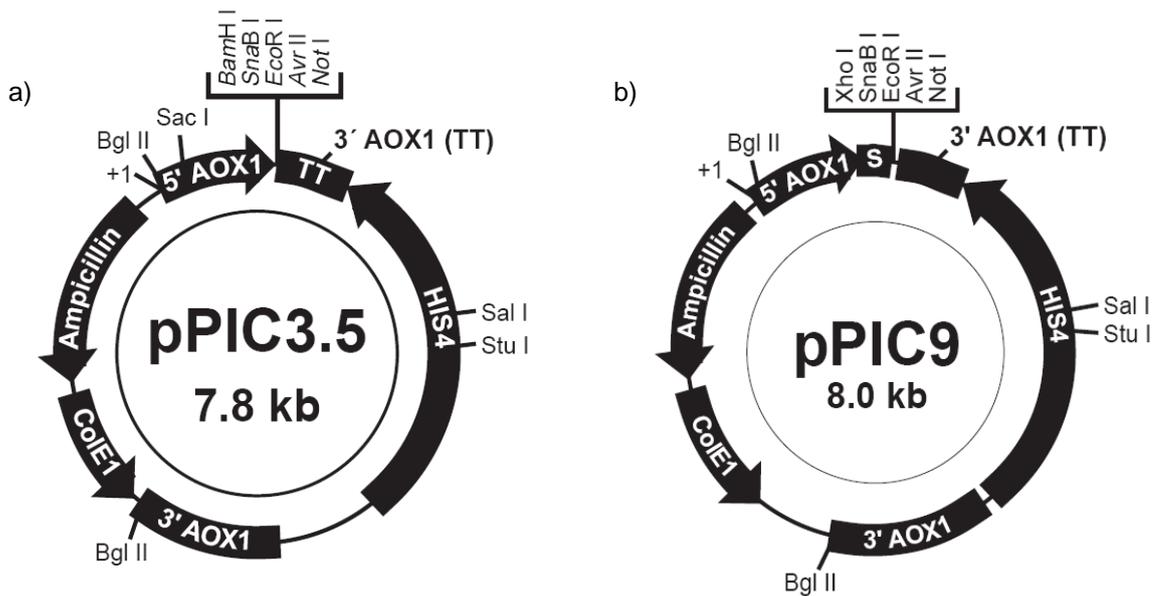


Abb. 7: Vektorkarten der *P. pastoris*-Expressionsvektoren pPIC3.5 und pPIC9. Beide Vektoren besitzen ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli* sowie das *HIS4*-Gen zur Selektion nach Integration in *his4*-Lokus im Genom von *P. pastoris*. Die dazu erforderliche Linearisierung der Vektoren erfolgte durch Restriktion mit *SalI*. Die Expression wird durch den Methanol-induzierbaren *AOX1*-Promotor gesteuert. Wurde das Protein-eigene Sekretionssignal verwendet, wurde das Konstrukt über *BamHI/NotI* oder *EcoRI/NotI* in den Vektor pPIC3.5 (a) eingebracht. Der Vektor pPIC9 (b) enthält das Sekretionssignal des α -Mating-Faktors, was eine effiziente Sekretion des gewährleistet. Die Konstrukte wurden über *XhoI/NotI* in den Vektor kloniert, wobei im 5' Bereich des Konstrukts eine Kex2p-Schnittstelle zur Abspaltung des Sekretionssignals rekonstituiert werden musste (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen).

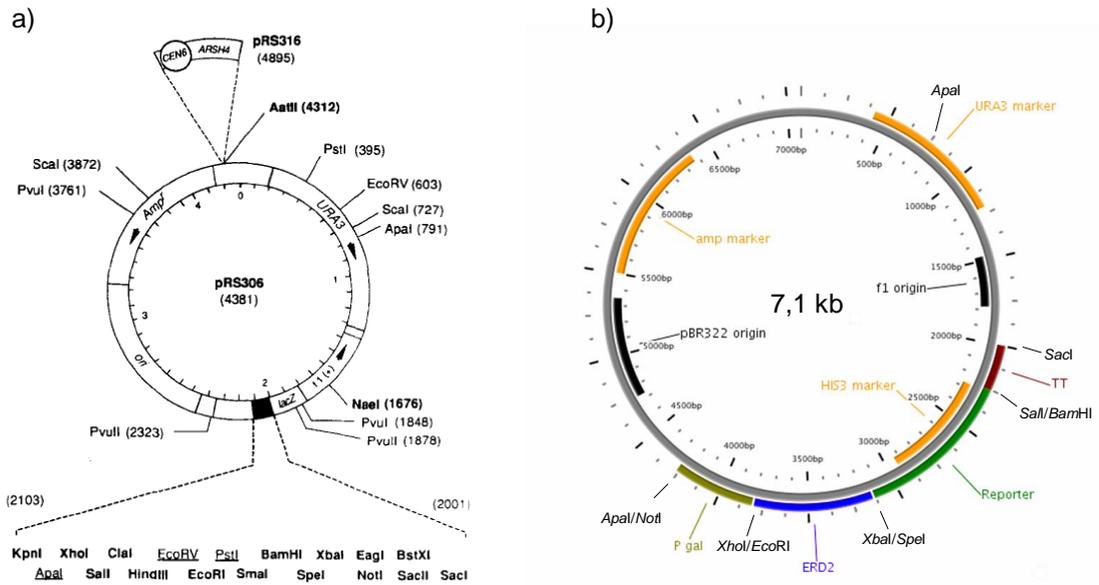


Abb. 8: Vektorkarten des *S. cerevisiae* Expressionsvektors pRS316. Der Centromervektor besitzt ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli* sowie ein *URA3*-Marker-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae*. **a)** pRS316 Original-Plasmid (Sirkorski & Hieter, 1989) **b)** pRS316 mit Promotor P_{GAL1} und Terminator *CYC1*, *ERD2* ohne Stopp-Codon sowie der Reporter-kassette *V5-SUC2A-HIS3* (Gießelmann, 2007).

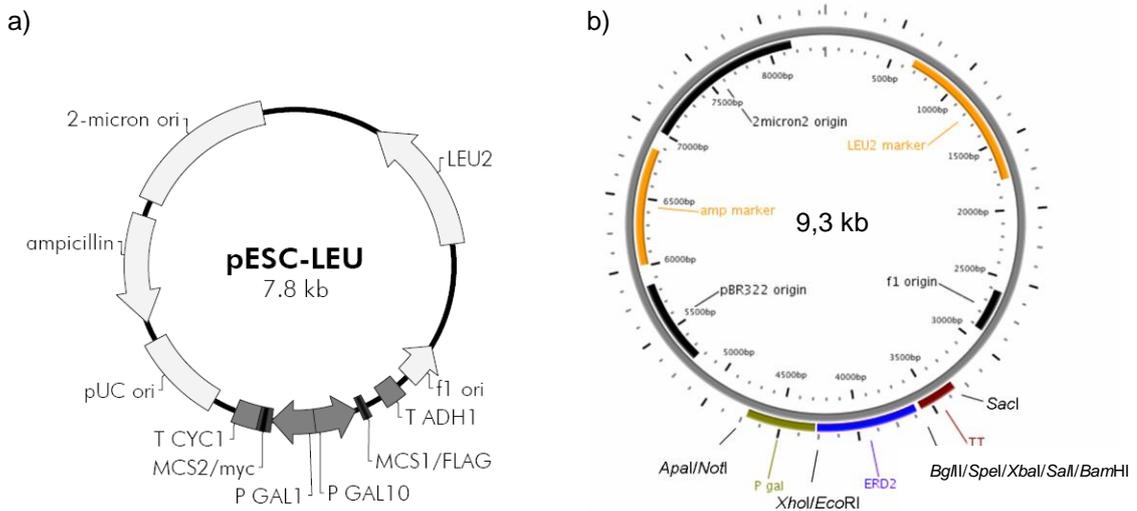


Abb. 9: Vektorkarte des pESC-LEU Vektors. **a)** Der Vektor pESC-LEU enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli* sowie ein *LEU2*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae* (Stratagene). **b)** Durch *Apal/SacI*-Restriktion wurde die Expressionkassette aus pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, *CYC1*-Terminator sowie dem zu exprimierenden Konstrukt, einer Erd2-Variante, in den Grundvektor pESC-LEU kloniert.

2.4.2. Oligonukleotide

Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und sind Tab. 8 zu entnehmen. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe des Programms „Lasergene“ von DNASTAR.

Tab. 8: Oligonukleotidprimer. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, Stopp- und Startcodons sowie Basenaustausche fettgedruckt. Die Sequenz ist in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Name (Referenz)	Sequenz (5'- 3' Orientierung)	Amplifikat
5' K28 wo SP <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I (Walch, 2006)	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Xho</i> I ↓ <i>Kex</i> 2p A <u>AGATCT</u> <u>CTCGAG</u> AAA AGA ATG CCG ACA TCT GAG AGA CAG CAG GG	proK28
5' K28 ORF <i>Xho</i> I/ <i>Eco</i> RI (Hoffmann, unveröffentlicht)	↓ <i>Xho</i> I ↓ <i>Eco</i> RI <u>CTCGAG</u> <u>GAATTC</u> ATG GAG AGC GTT TCC TCA TTA TTT AAC ATT TTT	präproK28
5' SOE β-mCherry	GGT GAC GAC GAG GCA AGG TGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG G	βmCherry
3' SOE β-mCherry	C CTC CTC GCC CTT GCT CAC CAT GCA CCT TGC CTC GTC GTC ACC	βmCherry
3' mCherry HDELRL <i>Not</i> I/ <i>Sal</i> I/ <i>Bgl</i> II	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Sal</i> I ↓ <i>Not</i> I <u>AGATCT</u> <u>GTCGAC</u> <u>GCGGCCGC</u> TTA GCG TAG CTC ATC GTG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GC	mCherry ^{HDELRL}
3' mCherry <i>Not</i> I/ <i>Sal</i> I/ <i>Bgl</i> II	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Sal</i> I ↓ <i>Not</i> I <u>AGATCT</u> <u>GTCGAC</u> <u>GCGGCCGC</u> TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G	mCherry
5' mCherry <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Xho</i> I ↓ <i>Kex</i> 2p A <u>AGA TCT</u> <u>CTC GAG</u> AAA AGA ATG CCG ACA TCT GAG AGA CAG CAG GG	mCherry
3' mTFP HDELRL <i>Not</i> I/ <i>Sal</i> I/ <i>Bgl</i> II	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Sal</i> I ↓ <i>Not</i> I <u>AGATCT</u> <u>GTCGAC</u> <u>GCGGCCGC</u> TTA GCG TAG CTC ATC GTG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GTC	mTFP ^{HDELRL}
5' SOE β-mTFP	GGT GAC GAC GAG GCA AGG TGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG AC	βmTFP
3' SOE β-mTFP	GT CTC CTC GCC CTT CGT CAC CAT GCA CCT TGC CTC GTC GTC ACC	βmTFP
5' mTFP <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Xho</i> I ↓ <i>Kex</i> 2p A <u>AGATCT</u> <u>CTCGAG</u> AAA AGA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG AC	mTFP
5' proβ <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I	↓ <i>Bgl</i> II ↓ <i>Xho</i> I ↓ <i>Kex</i> 2p <u>AGATCT</u> <u>CTCGAG</u> AAA AGA ATG CCG ACA TCT GAG AGA CAG CAG GGC TTA GAA GAA CGT GCT AGT ATT GAT GAT GCG GTG TGG TTA C	proβ

Name (Referenz)	Sequenz (5'- 3' Orientierung)	Amplifikat
5' SOE βGFP	GGT GAC GAC GAG GCA AGG TGC ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC ACT GGT GTT G	βGFP
3' SOE βGFP	C AAC ACC AGT GAA TAA TTC TTC ACC TTT AGA CAT GCA CCT TGC CTC GTC GTC ACC	βGFP
3' GFP HDEL ^R <i>NotI/SalI/BglII</i>	<i>↓BglII</i> <i>↓SalI</i> <i>↓NotI</i> <u>AGATCT GTCGAC GCGGCCGC</u> TTA GCG TAG CTC ATC GTG TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC ATG GGT AAT ACC	GFP ^{HDEL^R}
3' GFP <i>NotI/SalI/BglII</i>	<i>↓BglII</i> <i>↓SalI</i> <i>↓NotI</i> <u>AGATCT GTCGAC GCGGCCGC</u> TTA TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC ATG GGT AAT AC	GFP
5' Kar2 <i>BamHI/XhoI</i>	<i>↓BamHI</i> <i>↓XhoI</i> <u>GGATCC CTCGAG</u> ATG TTT TTC AAC AGA CTA AGC GCT GGC	Kar2
3' Kar2 HDEL ^R <i>SalI/NotI</i>	<i>↓SalI</i> <i>↓NotI</i> <u>GTCGAC GCGGCCGC</u> CTA GCG CAA TTC GTC GTG TTC GAA ATA ATC ACC ATC	Kar2 ^{HDEL^R}
3' Kar2 ΔHDEL <i>SalI/NotI</i>	<i>↓SalI</i> <i>↓NotI</i> <u>GTCGAC GCGGCCGC</u> CTA TTC GAA ATA ATC ACC ATC GTC ATC TTC ATC	Kar2 ^Δ
5' His Kar2 ΔSP <i>NdeI</i>	<i>↓NdeI</i> CAT ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT GCC GAT GAT GTA GAA AAC TAC GGA ACT G	HisKar2
3' Kar2 HDEL <i>SalI/NotI</i>	<i>↓SalI</i> <i>↓NotI</i> <u>GTCGAC GCGGCCGC</u> CTA CAA TTC GTC GTG TTC GAA ATA ATC ACC ATC	Kar2 ^{HDEL}
5' Erd2 <i>XhoI/EcoRI</i> (Gießelmann, 2007)	<i>↓XhoI</i> <i>↓EcoRI</i> <u>CTCGAG GAATTC</u> ATG AAT CCG TTT AGA ATC TTA GGT GAT TTA TCA CAT C	Erd2
3' Erd2 KR ₂₀₈ <i>SalI</i>	<i>↓SalI</i> <u>GTC GAC</u> TTA TTT TGG CAG TTT GAA ACC CTT TCC TCT GAT GAC TCT AGT GTA GTA AAT GTA AAA G	Erd2 KR ₂₀₈
3' Erd2 KR ₂₁₃ <i>SalI</i>	<i>↓SalI</i> <u>GTC GAC</u> TTA TTT TGG CAG TTT GAA ACC CCT TCC TCT GAT GAC TTT AGT GTA GTA AAT GTA AAA G	Erd2 KR ₂₁₃
3' Erd2 KR ₂₁₆ <i>SalI</i>	<i>↓SalI</i> <u>GTC GAC</u> TTA TTT TGG CAG TCT GAA ACC CTT TCC TC	Erd2 KR ₂₁₆
3' Erd2 KR ₂₁₉ <i>SalI</i>	<i>↓SalI</i> <u>GTC GAC</u> TTA TCT TGG CAG TTT GAA ACC CTT TCC TC	Erd2 KR ₂₁₉
3' Ubiquitin <i>BamHI</i>	<i>↓BamHI</i> <u>GGA TCC</u> TTA TCT TAG CCT TAG CAC AAG ATG TAA GGT GGA C	Ubiquitin K/R G75Δ G76Δ
5' SOE Ubiquitin-Erd2	GGA AGG GGT TTC AGA CTG CCA AGA ATG CAG ATT TTC GTC AGA ACT TTG ACC G	Erd2 K/R- Ubiquitin K/R G75Δ G76Δ

Name (Referenz)	Sequenz (5'- 3' Orientierung)	Amplifikat
3' SOE Ubiquitin-Erd2	CGG TCA AAG TTC TGA CGA AAA TCT GCA TTC TTG GCA GTC TGA AAC CCC TTC C	Erd2 K/R- Ubiquitin K/R G75Δ G76Δ
5' SOE Erd2 ANEA	GGG TCT AAA AGA ACC AAC ACC ATT GCG GCT AAT GAA GCT CTT ATG CAT GAT ACC TTT AAG ATC	Erd2 ANEA
3' SOE Erd2 ANEA	GAT CTT AAA GGT ATC ATG CAT AAG AGC TTC ATT AGC CGC AAT GGT GTT GGT TCT TTT AGA CCC	Erd2 ANEA
3' Erd2 Sall/XbaI/SpeI/BglII (Dausend, 2010)	↓Sall ↓XbaI ↓SpeI ↓BglII <u>GTCGAC</u> <u>TCTAGA</u> <u>ACTAGT</u> <u>AGATCT</u> TTA TTT TGG CAG TTT GAA ACC CTT TCC TCT	Erd2
5'Apm4 XhoI/SalI	↓XhoI ↓SalI <u>CTCGAG</u> <u>GTCGAC</u> ATG ATT AGT GGT GTG CTG GTA TAC TCA TCG AGA G	Apm4
3' Apm4 Δ Stopp SpeI/PauI	↓SpeI ↓PauI <u>ACTATG</u> <u>GCGCGC</u> GTA CCT CAC CTC GTA AGA ACC GGC TTT C	Apm4 ohne Stopp
3' Apm4 PauI	↓PauI <u>GCGCGC</u> CTA GTA CCT CAC CTC GTA AGA ACC GGC TTT C	Apm4

2.4.3. PCR („polymerase chain reaction“)

Die *in vitro* Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und basiert auf der zyklischen Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen durch thermostabile DNA-Polymerasen. Zur Initiation der Amplifikation dienen synthetische einzelsträngige Oligonukleotide, sogenannte Primer, die komplementär an die 5'- und 3'-Bereiche der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz binden. Im ersten Schritt der Reaktion wird die doppelsträngige DNA zunächst bei 94 - 98 °C denaturiert, so dass sich die komplementären Primer anlagern können. Die „Annealing“-Temperatur im folgenden Schritt ist abhängig von der Länge und der Sequenz der Primer. Sie sollte 3 - 5 °C unter deren Schmelztemperatur liegen. Anschließend erfolgt die Elongation, d.h. die Neusynthese des DNA-Abschnittes durch den Einbau von Desoxynukleotiden durch die DNA-Polymerase. Das freie 3'-OH-Ende der Primer dient dabei als Startpunkt zur DNA-Duplikation in 5' → 3' Richtung. Das Temperaturoptimum der Polymerase bestimmt die Reaktionstemperatur, die z. B. für die *Taq*-Polymerase bei 72 °C liegt. Die Wiederholung dieser drei Schritte in mehreren Zyklen führt zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Amplifikate. Um die Mutationsrate im Hinblick auf eine folgende Klonierung des PCR-Produktes gering zu halten, wurde die Zyklenzahl auf maximal 25 begrenzt.

2.4.3.1. Standard-PCR

Als Polymerase wurde die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt (Saiki *et al.*, 1988). Da diese keine 3'-5'-Korrekturlesefunktion besitzt, wurde zusätzlich die *Tgo*-Polymerase aus *Thermococcus gorgonarius* zugegeben, welche diese Funktion ausübt („Expand high fidelity PCR System“, Roche). Die *Taq*-Polymerase fügt an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Desoxyadenosin an, wodurch das Produkt direkt zur TOPO- oder AccepTor-Klonierung verwendet werden kann. Die PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt:

PCR-Puffer mit Magnesiumchlorid	2,50	µl
3'-Primer (100 pmol/µl)	0,25	µl
5'-Primer (100 pmol/µl)	0,25	µl
dNTP's (25 µmol)	0,50	µl
Template DNA (100 µg/ml)	1,00	µl
Polymerase (“Expand high fidelity PCR System“)	0,25	µl
H ₂ O _{steril}	ad 25,00	µl

Die Durchführung erfolgte im Thermocycler „Primus 96 advanced“ (Peq Lab) oder „Mastercycler“ (Eppendorf) nach folgendem Programm:

95 °C	2 min	} 25 Zyklen
95 °C	20 s	
57 °C	20 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

Die PCR-Bedingungen wurden hinsichtlich der verwendeten Primer und der DNA-Fragment-Größe variiert: Die Elongationszeit hängt sowohl von der Polymerase als auch von der Größe der zu amplifizierenden DNA-Sequenz ab und wurde entsprechend angepasst. Die *Taq*-Polymerase polymerisiert ca. 1000 Basen pro Minute. Wurde chromosomale Hefe-DNA als Template eingesetzt, wurde der primäre Denaturierungsschritt verlängert (8 min bei 97 °C). Die Polymerase wurde in diesem Fall erst nachträglich zugegeben („hot start PCR“). Zur Kontrolle der PCR wurde der Ansatz durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das PCR-Produkt gegebenenfalls reisoliert (Punkt 2.4.9).

2.4.3.2. SOE-PCR

Die SOE-PCR („splicing by overlapping extension“) ermöglicht eine direkte Klonierung von Fusionsproteinen auf DNA-Ebene, wobei das Einfügen von Schnittstellen am 3'- bzw. 5'-Ende des jeweiligen Gens nicht notwendig ist (Horton *et al.*, 1989). Zwei verschiedene DNA-Fragmente werden durch den Einsatz vier verschiedener Primer zu einem rekombinanten Produkt verbunden. In einem ersten Schritt werden die beiden einzelnen Gene in zwei getrennten Ansätzen mit geeigneten Primern so amplifiziert, dass die an ihrem 3'- bzw. 5'-Ende überlappende komplementäre Sequenzen erhalten. In einer zweiten PCR werden die ersten PCR-Produkte als Template verwendet: Durch die „sticky-end“-Sequenzen können sich die Amplifikate zusammenlagern. Das entstandene Fusionsgen wird durch geeignete Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifiziert.

Die PCR-Ansätze und Programme der ersten PCR entsprachen dem Schema unter Punkt 2.4.3.1. Nach dieser PCR wurden die Ansätze gelelektroporetisch aufgetrennt und die PCR-Produkte entsprechender Größe reisoliert. Je 2,5 µl dieser Reisolat wurden als Template für die zweite PCR-Reaktion zur Herstellung des Fusionsgens eingesetzt. Die „Annealing“-Temperatur für diese PCR wurde auf 54 °C reduziert.

2.4.3.3. „Colony“-PCR

Bei dieser Form der PCR wird keine isolierte DNA als Template verwendet, sondern direkt eine frische *E. coli*-Kolonie in den PCR-Ansatz überführt. Durch einen primären Denaturierungsschritt wird die DNA für die Polymerase zugänglich gemacht. Diese Methode erleichterte die Identifikation eines *E. coli* Klons mit korrektem Insert nach einer Ligation oder TA-Klonierung. Dazu werden Primer verwendet, welche im Vektor im 5'- und 3'-Bereich der „Multiple Cloning Site“ (MCS) binden. Anhand der Größe des PCR-Produktes kann auf das Vorhandensein eines Inserts geschlossen werden.

Zur „Colony“-PCR wurde ein Teil einer frischen *E. coli*-Kolonie auf einer Antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C zur bis zur weiteren Verwendung kultiviert, die restlichen Zellen wurden direkt in den PCR-Ansatz überführt. Ein PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

PCR-Puffer mit Magnesiumchlorid	1,0 µl
3'-Primer (100 pmol/µl)	0,1 µl
5'-Primer (100 pmol/µl)	0,1 µl
dNTP's (25 µmol)	0,1 µl
DMSO	0,6 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl
H ₂ O _{steril}	ad 10,0 µl

Das PCR-Programm entsprach bis auf einen initialen dreiminütigen Denaturierungsschritt dem Standardprogramm (Punkt 2.4.3.1). Der PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Plasmid-DNA von positiven Klonen isoliert und zur Kontrolle eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

2.4.3.4. Hefe-„Colony“-PCR

Nach dem oben beschriebenen Prinzip kann auch die Integration von Expressionskassetten in das Genom von *K. lactis* oder *P. pastoris* untersucht werden, ohne dass zuvor chromosomale DNA isoliert werden muss. Dazu wurde ein Teil einer frischen Hefekolonie auf dem entsprechenden Selektionsagar ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die restlichen Zellen wurden in 30 µl H₂O dest. gelöst, 45 s in der Mikrowelle erhitzt und 5 µl dieser Suspension zur PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz entsprach folgendem Schema:

PCR-Puffer mit Magnesiumchlorid	3,0 µl
3'-Primer (100 pmol/µl)	0,3 µl
5'-Primer (100 pmol/µl)	0,3 µl
dNTP's (25 µmol)	0,3 µl
Zellsuspension	5,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,3 µl
H ₂ O _{steril}	ad 30,0 µl

Das PCR-Programm ist unter Punkt 2.4.3.1 zu finden, jedoch wurde der primäre Denaturierungsschritt auf 3 min erhöht und die „Annealing“-Temperatur sowie die Elongationszeit den verwendeten Primern und der Amplifikatgröße angepasst. Der PCR-Ansatz wurde im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Kontrolle der Integration der Expressionskassette aus pKLAC in das Genom von *K. lactis* wurden zwei verschiedene Primerkombinationen verwendet, so dass anhand der Amplifikatgröße auf eine Einfach- oder Mehrfachintegration geschlossen werden konnte. Die Integrationsprimer 1 und 2 erlauben eine Vervielfältigung der einfach integrierten Expressionskassette, da sie im 5'-Bereich des chromosomalen *LAC4*-Promotors und im Bereich 3' des *LAC4*-Promotors der Expressionskassette binden. Das resultierende PCR-Produkt von 1,9 kb lässt auf eine Einfachintegration schließen. Der Integrationsprimer 3 bindet 5' vor dem *LAC4*-Promotor der Expressionskassette und führt daher in Kombination mit Integrationsprimer 2 zu einem PCR-Produkt von 2,3 kb, falls eine Mehrfachintegration stattgefunden hat (Abb. 10).

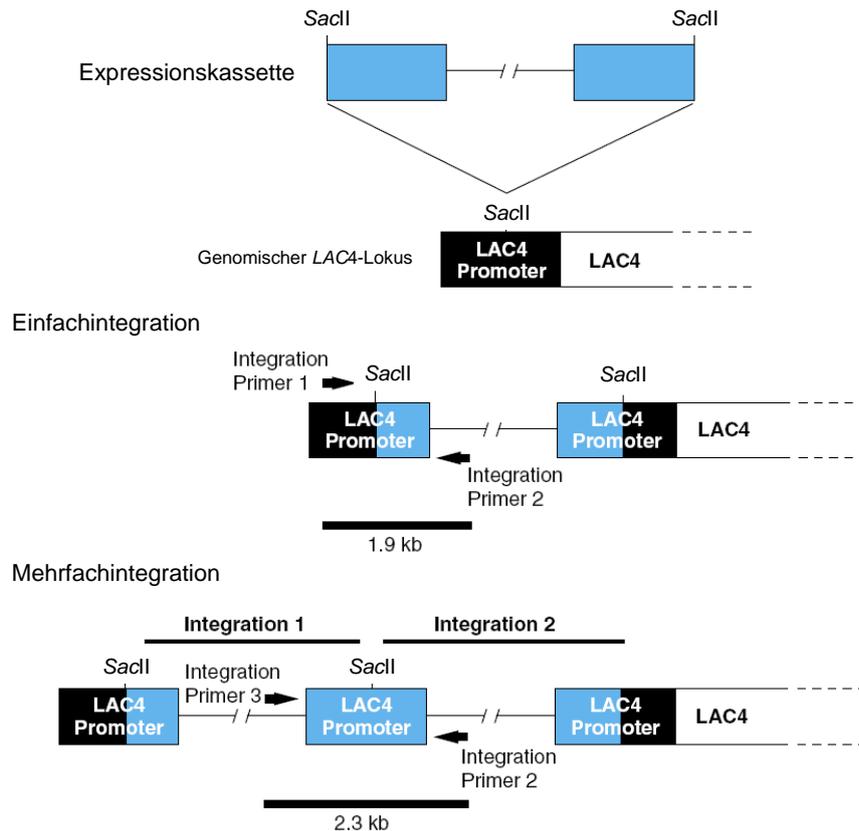


Abb. 10: Integration der pKLAC-Expressionskassette. Nach Transformation von *K. lactis* Zellen mit der linearisierten Expressionskassette inseriert das Fragment in den Promotor des *LAC4*-Lokus. Eine Einzelintegration kann durch PCR mit den Integrationsprimern 1 und 2 detektiert werden (1,9 kb PCR-Produkt), eine Mehrfachintegration mit den Integrationsprimern 2 und 3 (2,3 kb PCR-Produkt). (New England Biolabs, verändert).

Die „Colony“-PCR zur Überprüfung der Integration von Expressionskassetten in das Genom von *P. pastoris* wurde ebenfalls nach dem oben beschriebenen Prinzip durchgeführt. Allerdings war es nicht möglich zwischen Einfach- und Mehrfachintegration zu unterscheiden, da die Konstrukt- oder Vektor-spezifischen Primer nur eine Amplifikation der Expressionskassette erlauben.

2.4.4. „TA-Cloning“

Diese Methode zur direkten Klonierung eines PCR-Produktes nutzt die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Desoxyadenosin anzufügen (Clark, 1988). Durch die Verwendung eines Vektors mit Thymidin-Überhang lassen sich PCR-Fragmente leichter klonieren als in Vektoren mit „blunt ends“. Die kommerziell erhältlichen Vektoren mit Thymidin-Überhang liegen linearisiert vor und können daher direkt zur Ligation mit einem PCR-Produkt eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei dieser Systeme zur Klonierung von PCR-Produkten angewendet. Nach Kontrolle der Integration

durch Restriktionsanalyse konnten die eingebrachten DNA-Fragmente direkt sequenziert werden. Die Sequenzierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurde durch die Firma GATC durchgeführt. Die verwendeten Primer sind bei den jeweiligen Klonierungsvektoren aufgeführt.

2.4.4.1. „TOPO-Cloning“

Beim so genannten „TOPO-Cloning“ haben die bereits linearisierten Vektoren der Firma Invitrogen („pYES2.1 TOPO[®] TA Expression Kit“ oder des „TOPO TA Cloning[®] Kit Dual Promotor“) das Enzym Topoisomerase I aus dem Vaccinia Virus kovalent gebunden. Die Topoisomerase schneidet die DNA an der Erkennungssequenz (C/T)CCTT und bleibt über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent gebunden. Da der Vektor zwei benachbarte Schnittstellen enthält, sind beide DNA-Enden durch die Topoisomerase blockiert, so dass eine Religation verhindert wird (Shuman, 1994). Der Thymidin-Überhang am 3' Ende ermöglicht eine effiziente Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor.

Die Klonierung wurde entsprechend den Protokollen der Firma Invitrogen für den Vektor pYES2.1/V5-His TOPO (Manual Version J, Catalog no. K4150-01) oder den Vektor pCRII-TOPO (Manual Version O) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Transformation der im Kit enthaltenen chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen. Der Vektor pYES2.1 verfügt über ein Ampicillin-Resistenz-Marker zur Selektion sowie über einen Promotor P_{GAL1} und CYC1-Terminator zur direkten induzierbaren Expression des klonierten Gens in *S. cerevisiae*. Zur Sequenzierung können Primer, welche im 3' Ende des Promotors P_{GAL1} oder im Bereich des V5-Epitops binden, eingesetzt werden. Der Vektor pCRII-TOPO enthält zusätzlich zu einem Ampicillin- auch ein Kanamycin-Resistenz-Marker und die Möglichkeit zur Blau-weiß-Selektion. In den MCS-flankierenden Regionen können der SP6-Promotor-sowie der T7-Promotor-Bereich mit entsprechenden Primern zur Sequenzierung genutzt werden.

2.4.4.2. „AccepTor-Cloning“

Der linearisiert vorliegende AccepTor Vektor pSTBlue-1 (Novagen) besitzt 3'dU-Überhänge, so dass eine direkte Ligation von PCR-Produkten mit 3' dA-Überhängen möglich ist. Wird der Vektor nach der Transformation in *E. coli* repliziert, wird Uracil durch Thymin ersetzt. Die Klonierung wurde nach dem Protokoll der Firma Novagen (AccepTor Vector Kits, TB248 05/01) durchgeführt. Der Vektor verfügt sowohl über einen Ampicillin- als auch über einen Kanamycin-Resistenz-Marker und kann zur Blau-weiß-Selektion eingesetzt werden. Die MCS-flankierenden Bereiche der SP6- und T7-Promotoren können mit entsprechenden Primern zur Sequenzierung verwendet werden.

2.4.4.3. Blau-weiß-Selektion

Zur Kontrolle der Integration eines PCR-Produktes in die Vektoren pST-Blue oder pCRII-TOPO wurde eine Blau-weiß-Selektion durchgeführt. Beide Vektoren kodieren für die α -Untereinheit der β -Galaktosidase, wobei das *lacZ α* -Gen durch die MCS unterbrochen ist. Die α -Untereinheit besitzt allein keine β -Galaktosidase-Aktivität, sie komplementiert allerdings die chromosomal kodierte Ω -Untereinheit des Bakterienstamms in einem Vorgang, der als α -Komplementation bezeichnet wird. Das Enzym β -Galaktosidase kann den Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysieren. 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Luftsauerstoff zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Bakterienkolonien, in denen das *lacZ α* -Gen durch Insertion eines DNA-Fragments zerstört ist, enthalten keine funktionelle Form der β -Galaktosidase und bleiben nach Inkubation mit Farbstoff X-Gal weiß.

2.4.5. Plasmidisolierung aus *E. coli*

2.4.5.1. Alkalische Lyse

GTE-Puffer

Glukose	50	mM
Tris	25	mM
EDTA	10	mM

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8 eingestellt.

NaOH/SDS-Lösung

Natriumhydroxid	200	mM
SDS	1	% (w/v)

5 M Kaliumacetat-Lösung

Eisessig 99,5 %	29,5	%
-----------------	------	---

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 4,8 eingestellt.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) in abgewandelter Form angewendet. Diese einfache und schnelle Methode basiert auf der selektiven alkalischen Denaturierung von hochmolekularer chromosomaler DNA, während Plasmid-DNA als Doppelstrang erhalten bleibt. Der verwendete GTE-Puffer enthält EDTA, welches zweiwertige Metallionen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) bindet, die somit nicht mehr stabilisierend auf die Zellwand wirken können. Die in der Lösung enthaltene Glukose

gewährleistet ein stabiles osmotisches Milieu. Die Zugabe von SDS und Natriumhydroxid führt zur Zellyse, wobei SDS, ein anionisches Detergenz, Proteine und Proteinkomplexe solubilisiert. Durch Natriumhydroxid werden Plasmid- und chromosomale DNA denaturiert. Kaliumacetat führt zu einer Neutralisierung der Lösung, so dass Plasmid-DNA (ineinanderhängende Einzelstränge) im Unterschied zur chromosomalen DNA wieder renaturieren kann, während lineare DNA, hochmolekulare RNA sowie denaturierte Proteine präzipitieren und abzentrifugiert werden können. Ethanol bewirkt eine Fällung der Plasmid-DNA und der niedermolekularen RNA im Überstand. Um die RNA zu entfernen, wurde in der darauf folgenden Restriktionsanalyse RNase zugegeben.

Zur alkalischen Lyse wurden 1,5 ml Übernacht-Kultur pelletiert (20 s, 13.000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung gelöst. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS und einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung zugefügt und der Ansatz 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 800 µl 99%igem Ethanol gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die gelöste DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.5.2. Plasmidisolierung mittels „Mini-Prep“

Um hochreine Plasmid-DNA zu erhalten, wurde das „innuPREP Plasmid Mini Kit“ von Analytik Jena gemäß Herstellerangaben verwendet. Diese Methode beruht auf einer abgewandelten alkalischen Lyse. Das geklärte Lysat wird auf eine Miniprep-Säule geladen. Diese enthält eine Silikamembran, woran die Plasmid-DNA bindet und so immobilisiert wird. Durch mehrere Waschschriffe kann die DNA von Kontaminationen und Enzyminhibitoren gereinigt werden. Im Anschluss an das Trocknen der Säule wird die Plasmid-DNA mit Wasser eluiert und kann bei -20 °C gelagert werden.

2.4.6. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung kann photometrisch bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Da aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen, kann als Maß für die Reinheit einer DNA-Lösung der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet werden. Er sollte ungefähr bei 1,8 liegen. Abweichungen von diesem Wert deuten auf eine Verunreinigung der DNA hin.

Zudem kann die Absorption bei 230 nm bestimmt werden: ein erhöhter Wert kann ebenfalls auf Verunreinigungen hinweisen; 230 liegt nahe dem Absorptionswert von Peptidbindungen. Auch Puffersalze wie Tris und EDTA absorbieren bei dieser Wellenlänge.

Die Absorptionsmessungen wurden an einem Spektralphotometer („Ultrospec 2100 pro“, Amersham Biosciences) vorgenommen. Die DNA-Proben wurden 1 : 60 verdünnt und in Quarzküvetten mit H₂O dest. als Referenz gemessen. Das Gerät berechnet die DNA-Konzentration sowie die Quotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} . Außerdem kann die DNA-Konzentration durch eine vergleichende Agarosegelelektrophorese bestimmt werden. Als Referenz dient der Marker „HyperLadder“ (Bioline), mit dessen definierten Bandenstärken die Banden der Probe verglichen werden können.

2.4.7. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Breaking-Puffer

TritonX-100	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8 eingestellt.

TE-Puffer (10x)

Tris	100 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe wurde 1 ml einer frischen Übernacht-Kultur abzentrifugiert (3 min, 11.000 rpm) und mit 1,5 ml H₂O dest. gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl Breaking-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,03 g Glasperlen (0,45 - 0,55 mm) und 20 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol wurde die Suspension 3 min durch Vortexen gemischt und die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden 20 µl TE-Puffer zugeben und nach erneuten kurzem Mischen durch Vortexen die Phasen durch eine fünfminütige Zentrifugation (12.500 rpm) getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol (99 %) bei -20 °C gefällt. Nach 30 min konnte die DNA abzentrifugiert (3 min, 12.500 rpm) und getrocknet werden. Die DNA wurde in 30 µl H₂O dest. gelöst und bei 4 °C gelagert.

2.4.8. Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in beiden Strängen eines DNA-Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen Phosphodiester-Bindungen spalten. Die biologische Funktion dieser Enzyme ist die Spaltung fremder DNA, die in eine Bakterienzelle durch Virusinfektion oder Plasmidübertragung gelangt. Die Enzyme erkennen kurze Folgen (vier bis sechs Basenpaaren) von gegenläufig gleichen Nukleotiden (Palindrome) und schneiden die DNA meist versetzt, so dass kurze Einzelstrangüberhänge („sticky ends“) mit einem 5'Phosphat- und einem 3'OH-Ende entstehen. Bakterien schützen ihre eigene DNA durch Methylierung von Adenin oder Cytosin vor der Restriktion. Um DNA gezielt zu schneiden, werden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet: Sie sind unabhängig von funktionell dazugehörigen Methylasen, benötigen Magnesium-Salze als Kofaktoren und schneiden direkt an der Erkennungsstelle. Die Bezeichnung der Enzyme leitet sich von ihrer Herkunft ab. Das Enzym *EcoRI* stammt zum Beispiel aus dem *Escherichia coli* Stamm RY13. Die römische Ziffer gibt an, wie viele Enzyme bereits aus der Spezies isoliert wurden.

Zur Restriktion wurden Enzyme der Firma Fermentas oder der Firma Roche verwendet. Ein Restriktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

DNA	0,5 - 1 µg
10x Puffer	2 µl
Restriktionsendonuklease I	5 U
Restriktionsendonuklease II	5 U
RNase A (Fermentas)	5 U
H ₂ O dest.	ad 20 µl

Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein präparativer Verdau wurde durchgeführt, wenn linearisiertes Plasmid und Insert nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel reisoliert und ligiert werden sollten. Dazu wurde der oben genannte Ansatz mit ca. 0,4 bis 0,7 µg DNA drei Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.4.9. Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (10x)

Tris	890	mM
Borsäure	890	mM
EDTA	20	mM

GLB-Puffer

Glyzerin	50,00	% (v/v)
SDS	1,00	% (w/v)
EDTA	125,00	mM
Bromphenolblau	0,05	% (w/v)
Xylencyanol	0,05	% (w/v)

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten nach ihrer Größe durchgeführt: Die negativ geladenen Nukleinsäuren werden im elektrischen Feld in einer Agarose-Matrix getrennt. Die Auftrennungsgeschwindigkeit hängt dabei neben der Nettoladung auch von der Größe und Konformation der DNA-Fragmente ab: Lineare doppelsträngige DNA-Moleküle wandern durch die Agarosematrix mit Geschwindigkeiten, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe sind. Zudem beeinflussen Stromstärke, Pufferbedingungen und Porengröße die Auftrennung. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente, die als einzelne Banden sichtbar werden, erfolgt durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker. Es wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 1%ige oder 2%ige Agarosegele hergestelt: Die entsprechende Menge an Agarose wurde in TBE-Puffer durch mehrmaliges Aufkochen gelöst und die Flüssigkeit nach kurzem Abkühlen in die Gelkammer gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x TBE-Puffer gefüllt, die Taschen im Gel mit der zu untersuchenden DNA-Probe, versetzt mit 1/5 Volumen GLB. Durch das im GLB-Puffer enthaltene Glyzerin sinkt die Probe in die Tasche; der Zusatz der Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenxanol ermöglicht ein Verfolgen der Lauffront. Bei Verwendung des Markers „O'GeneRuler DNA Ladder Low Range“ wurden die entsprechende Menge der mitgelieferten 6x „Orange Loading Dye Solution“ verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 8 V/cm. Zur Visualisierung der DNA wurde die Gelplatte in einer Ethidiumbromid-Lösung (2,5 µg/ml) gefärbt (Aaij & Borst, 1972). Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) interkaliert in Nukleinsäuren, was zu einer Zunahme der Fluoreszenzemission führt. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht lassen sich Nukleinsäuren detektieren (Waring, 1965). Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des „ChemiDoc XRS system“ und der Analyse-Software „Quantity One 4.6.2“ der Firma Biorad.

2.4.10. DNA-Reisolierung aus dem Agarosegel

Zur Reisolierung von DNA nach einer Agarosegelelektrophorese wurde das „E.N.Z.A. gel extraction kit“ (Omega) entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. DNA mit einer Größe von 50 bp bis 40 kb kann mit diesem System aus Agarosegelen isoliert werden. DNA, gelöst in einem Hochsalzpuffer, bindet an eine Silikamembran einer Zentrifugationssäule. Nach einem Waschschrift zur Entfernung von Proteinen, Salzen, Agarose und Ethidiumbromid kann die DNA mit Niedrigsalzpuffer oder H₂O dest. eluiert werden.

2.4.11. Ligation

Linearisierte DNA-Fragmente, die mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können *in vitro* durch das Enzym DNA-Ligase verbunden werden. Bei der ATP- oder NAD⁺-abhängigen Reaktion wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der freien 5'Phosphatgruppe und der 3'Hydroxylgruppe gebildet. Diese Reaktion wird zur Klonierung von Restriktionsfragmenten in Vektoren genutzt: Vektor und Insert werden mit gleichen oder kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten, so dass eine komplementäre Basenpaarung an den überstehenden Enden möglich ist und ein kovalent geschlossenes Ringmolekül entsteht.

Zur Ligation wurde der Restriktionsansatz aus inserthaltigem Plasmid und Zielvektor drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA aus dem Gel reisoliert, so dass eine Verunreinigung der DNA mit aktiven Restriktionsendonukleasen verhindert wurde. Die zur Ligation eingesetzte Insert- und Vektormenge wurde anhand der Bandenstärke im Agarosegel subjektiv bestimmt. Meist wurde ein Insert-Vektor-Verhältnis von 3 : 1 gewählt. Der Ligationsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Insert	17 µl
Vektor	17 - x µl
10x Ligationspuffer (Applichem)	2 µl
T4-DNA-Ligase (Applichem)	1 µl
H ₂ O dest.	ad 20 µl

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Bevor der Ligationsansatz zur Elektroporation in *E. coli* eingesetzt werden konnte, wurde er zur Verringerung des Salzgehaltes dialysiert. Dazu wurde der gesamte Ansatz auf ein 0,025 µm-Dialysefilter (Millipore) pipettiert und 1 h gegen 10%iges Glycerin dialysiert. Anschließend wurde der verbleibende Ligationsansatz zur Elektroporation eingesetzt.

2.4.12. Transformationsmethoden

2.4.12.1. Bakterien

Elektroporation

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5	%
Pepton	2,0	%
Natriumchlorid	10,0	mM
Glukose	20,0	mM
Kaliumchlorid	10,0	mM
Magnesiumchlorid	10,0	mM
Magnesiumsulfat	2,5	mM

Das SOC-Medium wurde autoklaviert.

Die Elektroporation ermöglicht eine Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. Durch elektrische Impulse bilden sich kurzzeitig Poren in der Zellmembran, so dass exogen applizierte DNA ins Zellinnere gelangen kann (Calvin and Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988). Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium 1%ig mit einer frischen *E. coli*-Übernacht-Kultur angeimpft und 4 - 5 h bei 37 °C auf dem Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis gestellt und 5 min bei 8000 Upm, 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem, 10%igem Glycerin gewaschen und zuletzt in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Die Suspension wurde in Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei 8000 rpm, 4 °C, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in gleichem Volumen 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 40 µl (ca. 10^{10} Zellen) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Elektroporation wurden 40 µl elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µl dialysierter Ligationsansatz (Dialyse: eine Stunde gegen 10%iges Glycerin auf 0,025 µm-Dialysefiltern (Millipore)) oder 1 µl Plasmid-DNA zugegeben. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei

200 Ω , 2,5 kV/cm, 25 μ F (Gene Pulser II, BioRad). Die Zugabe von 1 ml vorgewärmten SOC-Medium stabilisierte die Zellen. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C geschüttelt (220 rpm). 200 μ l, 300 μ l und 500 μ l der Suspension wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Chemisch kompetente Zellen

Zur Zwischenklonierung von PCR-Produktion wurden die Vektoren pST-Blue (Novagen) und pCRII-TOPO oder pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) verwendet. Zur Transformation wurden im Kit enthaltene chemisch kompetente Zellen eingesetzt. Die Vorgehensweise entsprach den Herstellerangaben.

2.4.12.2. Hefen

Kluyveromyces lactis

YCB-Agar mit 5 mM Acetamid

YCB-Medium-Pulver	11,7 g/l
Agar	20,2 g/l
1 M Natriumphosphatpuffer pH 7	3,0 %
100x Acetamid-Stammlösung	1,0 %

YCB-Medium mit Agar und Pufferstammlösung wurden getrennt autoklaviert und anschließend mit sterilfiltrierter Acetamid-Stammlösung komplettiert.

100x Acetamid (500 mM)

Acetamid	29,6 g/l
----------	----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Zur Transformation von *K. lactis* wurde das „*K. lactis* protein expression Kit“ (New England Biolabs) verwendet. Dazu wurde der Vektor pKLAC mit dem zu exprimierenden Gen mit *Sac*II restringiert, so dass die Expressionskassette linearisiert vorlag. Die Integration erfolgte in die Promotorregion des *LAC4*-Lokus des *K. lactis* Genoms (Abb. 11). Zur Selektion der Transformanten wurde YCB-Medium verwendet, das Acetamid als einzige Stickstoffquelle enthält. Hefezellen, welche die Expressionskassette in das Genom integriert haben, verfügen über das darin enthaltene *amdS*-Gen, welches für die Acetamidase kodiert. Positive Transformanten können daher Acetamid als Stickstoffquelle nur nutzen, nachdem es durch die Acetamidase zu Ammonium umgesetzt wurde.

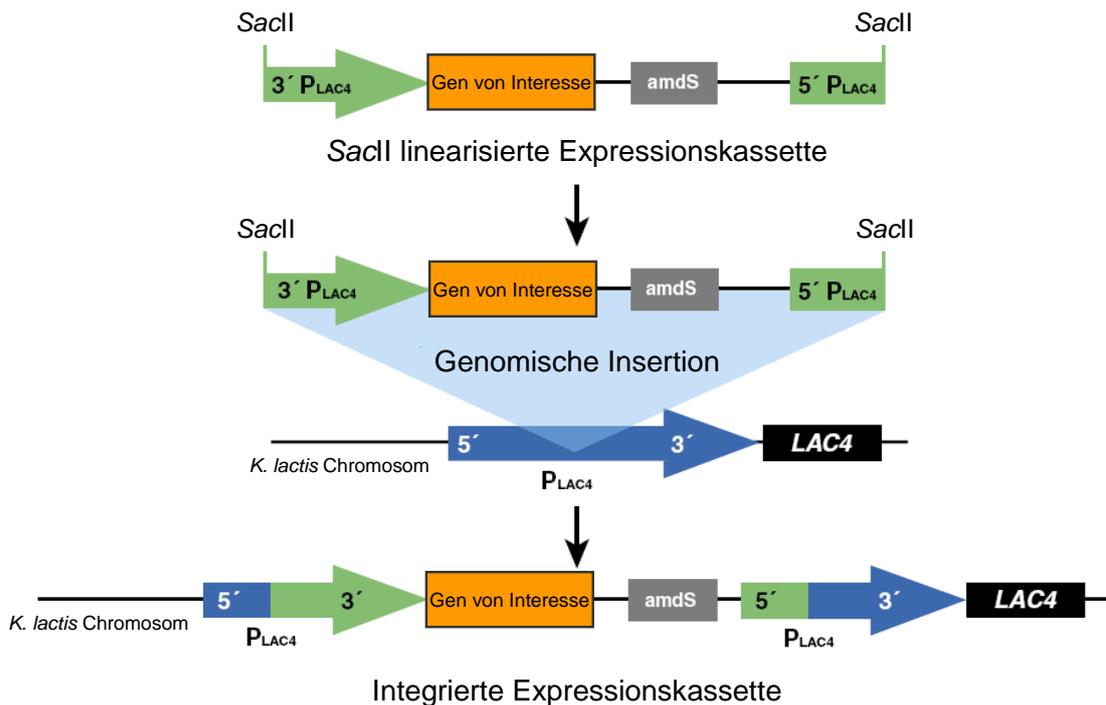


Abb. 11: Genomische Integration der linearen pKLAC1-Expressionskassette. Der Vektor pKLAC1 wurde mit SaclI linearisiert und die Expressionskassette, welche das zu exprimierende Gen sowie das *amdS*-Marker Gen enthält, in das Genom von *K. lactis* integriert. Die 5'- und 3'- *LAC4*-Promotor-Sequenzen ermöglichen eine gerichtete Insertion der Kassetten in die Promotorregion des *LAC4*-Lokus (New England BioLabs, verändert).

Zur Linearisierung der Expressionskassette wurden 5 µg DNA in einem 50 µl Ansatz mit SaclI über Nacht restringiert. 5 µl des Restriktionsansatzes wurden im Agarosegel zur Kontrolle aufgetrennt. Der restliche Ansatz wurde mit dem „E.N.Z.A. gel extraction kit“ (Omega) aufgereinigt und 3,75 µl davon mit 50 µl chemisch kompetenten Zellen (GG799) und 155 µl „NEB Yeast Transformation Reagent“ vorsichtig gemischt. Nach 30 min bei 30 °C folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (2 min, 7.000 rpm), in 1 ml H₂O dest. gewaschen und in 1 ml YPD-Medium aufgenommen. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen erneut mit H₂O dest. gewaschen und in 100 µl aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf einer Acetamid-haltigen YCB-Agar-Platte ausplattiert und 3 - 5 d bei 30 °C inkubiert.

***Saccharomyces cerevisiae* (Lithiumacetat-Methode)**TE-Puffer (10x)

Tris	100 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert

Lithiumacetat (10x)

Lithiumacetat	10 M
---------------	------

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt, anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert.

PEG-Lösung (50 %)

Polyethylenglykol-4000	50 % (v/v)
------------------------	------------

Die Lösung wurde autoklaviert.

Lithiumacetat-TE-Lösung

H ₂ O _{steril}	80 % (v/v)
10x Lithiumacetat-Lösung	10 % (v/v)
10x TE-Lösung	10 % (v/v)

Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

PEG-Lösung

PEG-Lösung	80 % (v/v)
10x Lithiumacetat-Lösung	10 % (v/v)
10x TE-Lösung	10 % (v/v)

Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

Diese Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, dass Alkali-Kationen die Kompetenz von Hefezellen zur DNA-Aufnahme stark erhöhen (Ito *et al.*, 1983). Lithiumacetat macht die Hefezellwand porös, was zu einer Steigerung der DNA-Aufnahmekapazität der Hefe führt. Die Transformation erfolgt in Kombination mit „Carrier“-DNA, wodurch die Transformationseffizienz erhöht wird (Schiestl & Gietz, 1989). Die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) und ein kurzzeitiger Hitzeschock führen schließlich zur eigentlichen DNA-Aufnahme.

1 ml einer *S. cerevisiae*-Übernacht-Kultur wurde abzentrifugiert (5 min, 8000 rpm, Raumtemperatur). Das Pellet wurde mit 500 µl frisch angesetzter LiAc-TE-Lösung gewaschen und in 100 µl Lithiumacetat-TE-Lösung resuspendiert. Eine Mischung aus 10 µl

„Carrier“-DNA (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml, hitzedenaturiert), 2 µl Plasmid und 3 µl 10x Lithiumacetat-Lösung wurde zu den Zellen gegeben. Nach Zusatz von 600 µl frisch angesetzter PEG-Lösung wurde der Ansatz 30 min bei 30 °C geschüttelt (220 rpm). Danach wurde ein Hitzeschock von 15 min bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, zweimal mit je 500 µl 1x TE-Lösung gewaschen und das Pellet in 500 µl 1x TE-Lösung aufgenommen. 150 µl und 350 µl dieser Suspension wurden auf den entsprechenden d/o- Platten ausplattiert und 3 - 5 d bei 30 °C inkubiert.

Pichia pastoris

BEDS-Puffer

10x Bicin-NaOH pH 8,3	10 %
Ethylenglykol	3 %
DMSO	3 %
Sorbitol	1 M

10x Bicin-NaOH pH 8,3

Bicin	100 mM
-------	--------

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 8,3 eingestellt.

1 M DTT

Dithiothreitol	1 M
----------------	-----

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

1 M Sorbitol-Lösung

Sorbitol	1 M
----------	-----

Die Lösung wurde autoklaviert.

Zur Transformation von *P. pastoris* wurde ein Protokoll von Lin-Cereghino *et al.* (2005) verwendet. Dieses vereint die Elektroporation nach Cregg und Russell (1998) mit der Herstellung kompetenter Zellen nach Dohmen *et al.* (1991). Zu den Vorteilen zählen die hohe Transformationseffizienz und Zeitersparnis. Die elektrokompenten Zellen können bei -80 °C gelagert werden.

Wie für *S. cerevisiae* beschrieben, kann lineare DNA auch in das Genom von *P. pastoris* durch homologe Rekombination integriert werden (Cregg *et al.*, 1985; Cregg *et al.*, 1989). Die Transformanten bleiben auch bei fehlendem Selektionsdruck stabil. Mehrfach-Integrationen treten bei etwa 1 - 10 % der Insertionen auf (Clare *et al.*, 1991). Zur Transformation wurden die Vektoren pPIC3.5 bzw. pPIC9 mit *SaI* linearisiert, so dass eine

Integration der linearisierten Vektoren am *his4*-Lokus ermöglicht wurde (Abb. 12). Der Mut („methanol utilization“) -Phänotyp bleibt dabei unverändert erhalten: Der *P. pastoris* Stamm KM71 weist einen Mut^S-Phänotyp („methanol utilization slow“) auf, was auf einen Verlust des Alkohol-Oxidase *AOX1*-Gens zurückzuführen ist (bedingt durch eine *aox1::ARG4*-Disruption). Die Zellen wachsen schlechter auf Methanol als einzige Kohlenstoffquelle, da nur noch das schwächere *AOX2*-Gen aktiv ist. Der Mut⁺-Phänotyp des Stamms GS115 hingegen ist auf eine wildtypische Methanol-Metabolisierung zurückzuführen, da *AOX1* funktional ist.

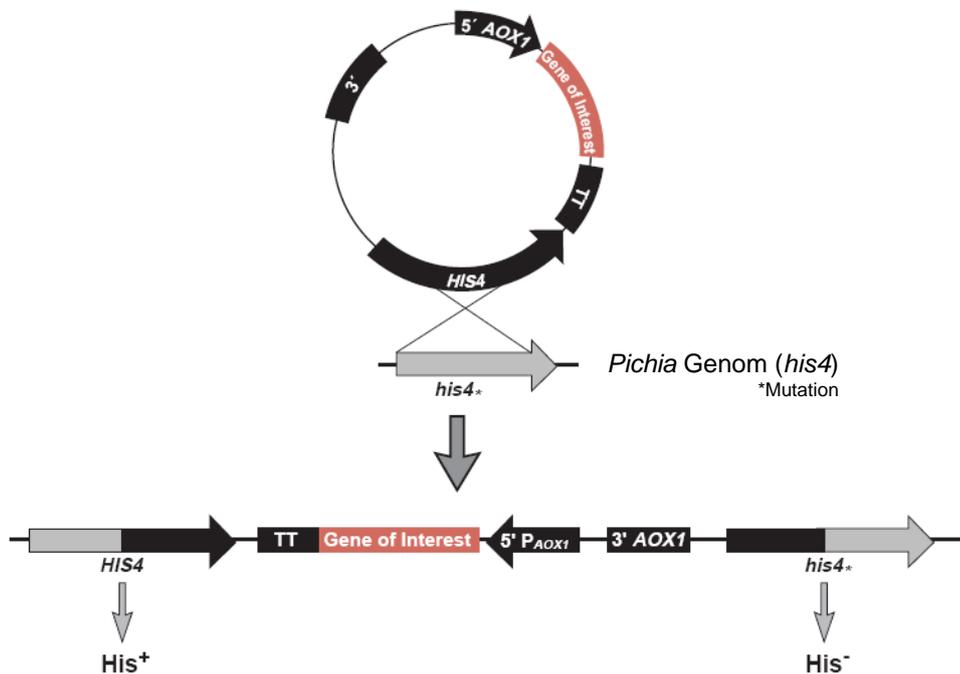


Abb. 12: Insertion der linearisierten *P. pastoris* Expressionsvektoren in das Genom von *P. pastoris*. Die Linearisierung der Vektoren pPIC3.5 bzw. pPIC9 durch *SalI*-Restriktion ermöglicht eine Integration der Expressionskassette in den *his4*-Lokus durch homologe Rekombination zwischen dem *HIS4*-Gen der Expressionskassette und dem genomischen *his4*-Lokus (Daly & Hearn, 2005; Invitrogen, verändert).

Zur Herstellung kompetenter *P. pastoris* Zellen wurden 50 ml YPD-Medium mit einer frischen Übernacht-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt und bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1 wurden die Zellen geerntet (5 min, 1900 rpm) und in 9 ml eiskaltem BEDS-Puffer, dem 1 ml 1 M DTT zugesetzt wurde, resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei 30 °C und 100 rpm wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (5 min, 2.300 rpm) und in 1 ml BEDS-Puffer aufgenommen. 55 µl-Aliquots wurden bei -80 °C.

Zur Transformation wurden die Vektoren pPIC9 oder pPIC3.5 mit *SaI* linearisiert. Dazu wurden 5 µg DNA in einem 50 µl Ansatz über Nacht restringiert. 5 µl des Restriktionsansatzes wurden im Agarosegel kontrolliert. Der restliche Ansatz wurde mit dem „E.N.Z.A. gel extraction kit“ (Omega) aufgereinigt und 5 µl der linearisierten DNA mit 55 µl elektrokompenten Zellen in einer Elektroporationsküvette gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Elektroporation bei 200 Ω, 1,5 kV/cm, 25 µF (Gene Pulser, BioRad) wurden sofort 1 ml kalte 1 M Sorbitol-Lösung sowie 0,5 ml YPD-Medium zugegeben. Nach dreistündiger Inkubation bei 30 °C und 220 rpm wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml H₂O dest. gewaschen (2 min, 7.000 rpm) und in 200 µl aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf his d/o-Platten ausplattiert und 3 - 5 d bei 30 °C inkubiert.

2.5. Hefespezifische Methoden

2.5.1. Zellzahlbestimmung

2.5.1.1. Gesamtzellzahl

Die mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl in Hefekulturen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) durchgeführt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Anzahl der in 80 Quadraten gezählten Zellen}}{80} \times 4.000.000$$

2.5.1.2. Optische Dichte

Zur Bestimmung der Optischen Dichte von Hefekulturen wurde die Extinktion an einem Spektrometer („Ultrospec 2100 pro“, Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm. Als Referenz diente unbeimpftes Medium.

2.5.2. Herstellung von Toxinkonzentrat

Zur Herstellung von K28-Toxinkonzentrat wurden die Kulturüberstände der Toxinproduzierenden Hefen je nach Volumen mit unterschiedlichen Methoden konzentriert. Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 8.000 rpm, 4 °C). Kulturüberstände mit einem Volumen bis 100 ml wurden filtriert (Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm) und über Vivaspinzentrifugationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Sartorius) nach

Herstellerangaben eingeengt (9.200 rpm, 4 °C). Kulturüberstände bis zu einem Volumen von 1 l wurden durch Ultrafiltration über eine 10 kDa Membran (Millipore) in einer Ultrafiltrationseinheit (Amicon 8400) bei 4 °C unter 2,5 bar Stickstoffatmosphäre konzentriert. Größere Volumina wurden entsprechend der Herstellung von K28wt Konzentrat behandelt (siehe unten). Zum Entsalzen wurde das erhaltene Konzentrat mit der fünf bis zehnfachen Puffermenge (McIlvaine Puffer pH 4,7, 1 : 10 verdünnt) aufgefüllt und erneut konzentriert.

Herstellung von K28wt-Konzentrat aus *S. cerevisiae*

Der *S. cerevisiae* K28-Superkiller MS300b wurde zur Herstellung von wildtypischem K28-Konzentrat verwendet. Das Volumen der Vorkultur betrug 1/10 des Hauptkulturvolumens und wurde 1%ig mit einer frischen Übernacht-Kultur in B-Medium angeimpft. Nach einer viertägigen Inkubation bei 20 °C unter leichtem Schütteln (60 rpm) wurde die Hauptkultur mit der gesamten Vorkultur angeimpft und ebenfalls 4 d unter leichtem Schütteln bei 20 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (20 min, 7.000 rpm, 4 °C) und der zellfreie Überstand mit Hilfe einer „Watson Marlow 6035“-Pumpe unter Druck von 1 bar über eine Polysulfonsäuremembran (Sarotrius, Ausschlussgrenze 10 kDa) bei 4 °C auf ein Volumen von 0,5 bis 1 l konzentriert. Das Konzentrat wurde erneut zentrifugiert (20 min, 7.000 rpm, 4 °C) und der erhaltene Überstand über einen 0,45 µm Membranfilter unter Vakuum filtriert. Das Filtrat wurde über eine Amicon Ultrafiltrationseinheit (siehe oben) weiter eingeengt, so dass schließlich ein 200faches Konzentrat entstand. Nach einer Sterilfiltration (Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm, Millipore) wurde die Aktivität des konzentrierten K28 im MBA gegen sensitive Hefen bestimmt (Punkt 2.5.4) und das Toxinkonzentrat bei -20 °C gelagert.

2.5.3. Fermentation von *P. pastoris*

Fermentationsmedium

Pro Liter Startvolumen:

Glyzerin	62,50 g
Calciumsulfat	0,09 g
Kaliumsulfat	14,76 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	11,67 g
Ammoniumsulfat	9,00 g
H ₂ O dest.	833 ml

Das Medium wurde im Fermenter autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Medium mit 4 ml PTM1-Lösung sowie 25 g Natriumhexametaphosphat (gelöst in 167 ml H₂O dest., sterilfiltriert) komplettiert.

50 % Glyzerin-Lösung

Glyzerin	176,4 g
H ₂ O dest.	140,0 ml

Die Lösung wurde autoklaviert. Anschließend wurden 3,36 ml PTM1-Lösung zugegeben.

Methanol-Lösung

Methanol	750 ml
PTM1-Lösung	9 ml

PTM1-Lösung

Kupfersulfat-Pentahydrat	5,99 g
10x Natriumiodid-Lösung	8,00 ml
Mangansulfat-Hydrat	3,00 g
Natriummolybdat-Dihydrat	0,20 g
Cobalt(II)chlorid	0,50 g
Zinkchlorid	20,04 g
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	65,50 g
100x Borsäure-Lösung	0,80 ml
Schwefelsäure (96,2 %)	19,20 ml
H ₂ O dest.	ad 1000,00 ml

Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung mit 0,4 g Biotin (in H₂O dest. gelöst und sterilfiltriert) komplettiert.

10x Natriumiodid-Lösung

Natriumiodid	0,4 g
H ₂ O dest.	ad 40,0 ml

100x Borsäure-Lösung

Borsäure	1 g
H ₂ O dest.	ad 40 ml

Zur Expression der K28-Toxinvarianten in *P. pastoris* wurde eine Fermentation durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit den pH-Wert des Mediums, den Sauerstoffpartialdruck, die Rührrate und die Methanolfütterung genau zu kontrollieren. Methanol dient nicht nur als einzige Kohlenstoffquelle, es induziert auch die Expression rekombinanter Proteine über den *AOX1*-Promotor. In hohen Konzentrationen inhibiert es jedoch das Wachstum der Hefe (Zhang *et al.*, 2000). Die Expression von rekombinantem Protein in *P. pastoris* durch den *AOX1*-Promotor gliedert sich in drei Phasen (Stratton *et al.*, 1998). Zunächst wachsen die Zellen in einem definierten Medium mit Glycerin schnell zu hoher Dichte, wobei der *AOX1*-Promotor durch Glycerin reprimiert wird (Glycerin-Batch Phase, Tschopp *et al.*, 1987). Anschließend wird Glycerin in limitierter Menge zugegeben, um die Zellmasse zu erhöhen und die Zellen auf die Induktion vorzubereiten (Derepression des *AOX1*-Promotors, Glycerin-Fed-Batch Phase). Die Zugabe von Methanol als einzige Kohlenstoffquelle induziert schließlich die Proteinexpression (Methanol-Fed-Batch Phase). Die Fermentation wurde in Anlehnung an Tolner *et al.* (2006) durchgeführt. Das verwendete Fermentationsmedium, eine Protein-freie Mineral-Salz-Lösung, ermöglicht eine relativ einfache Reinigung des sezernierten rekombinaten Proteins aus dem Kulturüberstand. Zudem sekretiert *P. pastoris* nur geringe Mengen an endogenem Protein.

Die Fermentation wurde in einem Labfors 3 Tischbioreaktor (Infors), verbunden mit einem Kryostaten (MultiTemp III, Pharmacia) zur Kühlung der Abluft durchgeführt. Die Vorkultur (150 ml Fermentationsmedium) wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 10 bis 12 inkubiert (220 rpm, 30 °C). Der Fermenter wurde mit 775 ml Fermentationsmedium befüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 145 ml Natriumhexametaphosphat-Lösung mit PTM1 sowie ca. 0,5 ml Antischaum (Breox) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 25 % Ammoniak auf 5,3 eingestellt. Die Temperatur wurde zunächst auf 29 °C und die Belüftung auf 2 vvm festgelegt. Der pO_2 -Gehalt wurde über eine zweistufige sequentielle Kaskadensteuerung geregelt. Der Sollwert von 25 % sollte dabei in einer ersten Stufe durch die Rührgeschwindigkeit (bis max. 1250 rpm) und in einer zweiten durch die Zugabe von reinem Sauerstoff erreicht werden. Der Fermenter wurde mit der Vorkultur angeimpft und bis zum vollständigen Verbrauch des im Fermentationsmedium vorhandenen Glycerins kultiviert (ca. 24 h). Dabei nimmt die Konzentration an gelöstem Sauerstoff mit zunehmender Biomasse stetig ab und steigt nach dem vollständigen Verbrauch des Glycerins wieder an, womit die erste Fermentationsphase (Glycerin-Batch-Phase) beendet ist. In der zweiten Phase wird die Biomasse durch Zugabe einer 50%igen Glycerin-Lösung (9 ml/h) erhöht. Nach 24 h waren die Zellen bis zu einer Dichte OD_{600} von 350 bis 400 gewachsen. Die Glycerin-Zugabe wurde beendet, wodurch die Sauerstoffkonzentration nach dem vollständigen Verbrauch des Glycerins stark anstieg. Die Zugabe von Methanol-Lösung (1,7 ml/h) führte zu einer Induktion der Proteinexpression. Daher wurde die

Temperatur auf 20 °C gesenkt. Zunächst wurde die Kultur langsam an das Wachstum auf Methanol gewöhnt, indem die Methanol-Zugabe ausgesetzt wurde. Erst bei einem limitierenden Wachstum (nach manueller Unterbrechung der Methanol-Zugabe steigt die Konzentration des gelösten Sauerstoffs stark an) wurde kontinuierlich Methanol (1,7 ml/h) zugefügt. Während der Fermentation wurde nach Bedarf Antischaum (Breox) in geringen Mengen (je 200 µl) zugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig durch Bestimmung der OD₆₀₀ kontrolliert. Zudem wurden Proben entnommen und die Menge des sezernierten heterologen Proteins mittels SDS-PAGE und Western-Blot oder Coomassie-Färbung bestimmt. Die biologische Aktivität des Toxins wurde im Agardiffusionstest ermittelt. Nach ca. 100 h wurde die Fermentation beendet und der Fermenterüberstand durch Zentrifugation (20 min, 10.000 rpm, 4 °C) geerntet und auf Eis gelagert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit (Amicon 8400) bei 4 °C unter 2,5 bar Stickstoffatmosphäre auf 250 ml bzw. fünffach konzentriert (Punkt 2.5.2), filtriert (0,2 µm) und mittels Gelfiltrationschromatographie (Punkt 2.8.8) in 10 % McIlvaine Puffer (pH 4,8 bzw. 5,3) überführt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert oder lyophilisiert (Punkt 2.8.10) und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.5.4. Agardiffusionstest

Minimal Methylenblauagar (MBA)

Lösung A

Aminosäure-Mix (2.2.2)	0,8 g/l
Zitronensäure	18,0 g/l
Ammoniumsulfat	5,0 g/l
Methylenblau	0,003 %

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

Lösung B

YNB	1,7 g/l
-----	---------

Lösung C

Glukose	20 g/l
oder Galaktose	30 g/l
Agar	20 g/l

Die Lösungen A und C wurden getrennt autoklaviert, Lösung B sterilfiltriert. Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen gemischt und je 15 ml in sterile Reagenzgläser aliquotiert.

Zum Nachweis der biologischen Aktivität der K28-Toxinvarianten oder zur Überprüfung der Toxinsensitivität von Hefen wurde ein Agardiffusionstest mit Methylblauagar (MBA) durchgeführt. Methylblau färbt spezifisch abgestorbene Zellen an (Borzani & Vairo, 1958). Je 1×10^6 Zellen einer frischen *S. cerevisiae* Übernacht-Kultur wurden in 15 ml verflüssigten und auf 54 °C abgekühlten MBA eingebettet. Nach Erstarren des Agars wurde mit Hilfe eines Korkbohrers ein Loch (Durchmesser 9 mm) in den Agar gestanzt und mit 100 µl eines K28-Toxinkonzentrates gefüllt. Nach einer drei- bis viertägigen Inkubation bei 20 °C sollte bei sensitiven Hefen ein Hemmhof, umgeben von einem blauen Ring abgestorbener Zellen, erkennbar sein. Die Sensitivität der Hefen bzw. die Killeraktivität des Toxinkonzentrats kann anhand des Hemmhofdurchmessers bestimmt werden. Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Hemmhofgrößen entsprechen dem Durchmesser abzüglich des ausgestanzten Lochs. Die halblogarithmische Beziehung zwischen der K28-Konzentration und der Hemmhofgröße wurde durch Aufnahme einer Toxineichgeraden gegen den hypersensitiven *S. cerevisiae* Stamm 192.2d verifiziert (Abb. 13).

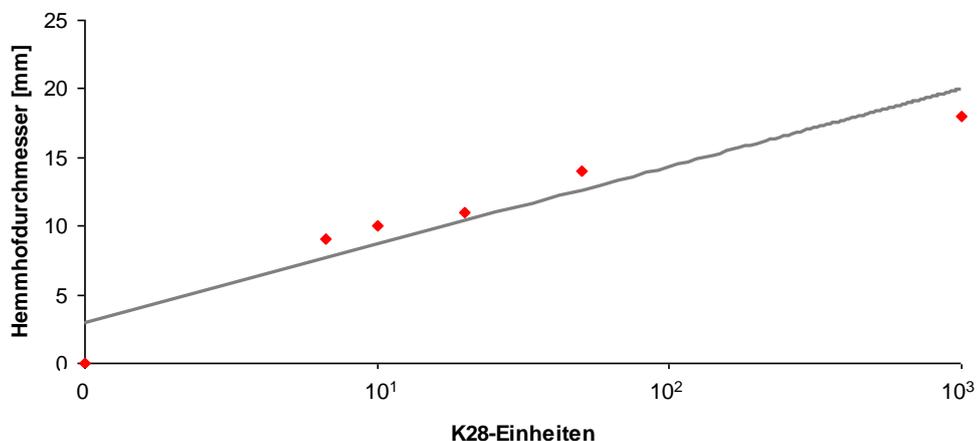


Abb. 13: Eichgerade zur Darstellung der mittels Methylblau-Agardiffusionstest ermittelten halblogarithmischen Beziehung zwischen dem Hemmhofdurchmesser und der K28-Toxinkonzentration. Die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d wurde in SC-Glucose-MBA eingebettet, K28-Toxinlösung in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und 3 d bei 20 °C inkubiert. Die Hemmhofangaben entsprechen dem Durchmesser abzüglich des ausgestanzten Lochs und wurden halblogarithmisch aufgetragen (Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9$). 10^3 Toxineinheiten entsprechen 100 µl des K28-Konzentrats (200fach), gewonnen aus MS300b.

Sphäroplastenregenerationsagar

Lösung A

Pepton	2,00	%
Hefeextrakt	1,00	%
Kaliumchlorid	0,60	M
Citrat	1,92	%

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

Lösung B

Glukose	2,0	%
Agar	1,5	%

Lösung A und B wurden getrennt autoklaviert und anschließend gemischt.

Um die biologische Aktivität von K28-Toxinvarianten an Sphäroplasten testen zu können, wurde Sphäroplastenregenerationsagar verwendet. Dazu wurden Zellen einer 50 ml Übernacht-Kultur (ca. 1×10^7 Zellen/ml) sphäroplastiert (Punkt 2.5.5), in Inkubationspuffer gewaschen und in 500 μ l Inkubationspuffer aufgenommen. Je 100 μ l der Zellsuspension wurden in 15 ml verflüssigten, auf 54 °C abgekühlten Regenerationsagar eingebettet. Nach Erstarren des Agars wurde ein Loch (Durchmesser 9 mm) in den Agar gestanzt und 100 μ l K28-Toxinkonzentrat eingefüllt. Nach drei- bis viertägiger Inkubation bei 20 °C konnte die Hemmhofgröße bestimmt werden. Um die Qualität der Sphäroplastierung zu überprüfen, wurden 100 μ l der Zellsuspension mit 1,9 ml H₂O dest. gevortext und nach zehnminütiger Zentrifugation (2.000 rpm, 4 °C) in 500 μ l H₂O dest. aufgenommen. Die Zellen wurden auf einer YPD-Platte ausplattiert und 3 d bei 30 °C inkubiert. Anhand der Anzahl der Kolonien kann auf die Güte der Sphäroplastierung geschlossen werden: Eine geringe Zahl deutet auf eine vollständige Sphäroplastierung hin.

2.5.5. SphäroplastierungSphäroplastierungspuffer

Sorbitol	800,0	mM
Tris	10,0	mM
Calciumchlorid	10,0	mM
Zymolyase 20 T	0,2	mg/ml
DTT	2,0	mM

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt. DTT und Zymolyase wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren unmittelbar vor Gebrauch frisch zugesetzt.

Inkubationspuffer

Mcllvaine Puffer pH 4,7	10	%
Sorbitol	800	mM
Glukose	10	mM
Calciumchlorid	10	mM

Nach Zugabe des Mcllvaine-Puffers wurde der pH erneut kontrolliert und auf 4,7 eingestellt. Calciumchlorid wurde sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

Mcllvaine-Puffer

Zur Herstellung des Citronensäure-Phosphat-Puffers nach Mcllvaine wurden 0,1 M Citronensäure-Lösung und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung bis zum Erreichen des gewünschten pH-Werts gemischt.

Die Sphäroplastierung von Hefezellen erfolgt durch den Verdau der Zellwand in osmotisch stabilisiertem Milieu: Das Enzym Zymolyase aus *Arthrobacter luteus*, eine β -1-3-Glukan-Laminaripentaonase, hydrolysiert Glukose-Polymere der Hefezellwand und bewirkt so deren Destabilisierung und Abbau (Kitamura *et al.*, 1971). Die Zugabe von DTT führt zu einer Reduktion von Disulfidbrücken. Zur Sphäroplastierung von *S. cerevisiae* nach Zhu und Bussey (1989) wurde folgendes Protokoll angewendet:

200 ml Flüssigmedium wurden mit einer frischen *S. cerevisiae*-Übernacht-Kultur am Vortag angeimpft, so dass sich die Zellen am Folgetag in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden (1×10^7 Zellen/ml). Die Kultur wurde abzentrifugiert (10 min, 5.000 rpm) und mit sterilem H₂O dest. gewaschen. Die Zellen wurden in 100 ml Sphäroplastierungspuffer aufgenommen und 90 min bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Die Sphäroplastierung wurde mikroskopisch kontrolliert: Durch Zugabe von H₂O dest. sollten mindestens 90 % der Hefezellen lysieren. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10 min, 2.000 rpm, 4 °C), mit Inkubationspuffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.5.6. Respirationstest

B88-Puffer

Hepes	20 mM
Kaliumacetat	150 mM
Sorbitol	800 mM
Magesiumacetat	5 mM
Glyzerin	10 %

Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Kalibrierungslösung k_{100} (Sauerstoff-gesättigtes Wasser)

10 ml H₂O dest. wurden in ein 15 ml Falcon gefüllt und unmittelbar vor Gebrauch 2 min kräftig geschüttelt.

Kalibrierungslösung k_0 (Sauerstoff-freies Wasser)

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 mg Natriumsulfit vorsichtig in 10 ml H₂O dest. gelöst, das Gefäß verschlossen und nach 1 min Inkubation verwendet.

Der von John *et. al.* (2003) entwickelte Vitalitätstest ermöglicht die Bestimmung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff in einer Mikrotiterplatte. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffes lässt direkt auf den Sauerstoffverbrauch der zu untersuchenden Zellen und damit auf ihre Vitalität schließen. Die sogenannten Oxoplates besitzen einen immobilisierten Fluoreszenz-Sensor, dessen Fluoreszenzintensität mit der Konzentration an gelöstem Sauerstoff korreliert. Jedoch kann es aufgrund von Fluktuationen, z. B. der Lichtintensität und der Detektor-Sensitivität, zu Problemen bei der Messung der Fluoreszenzintensitäten kommen. Daher dient ein zweiter Fluorophor als interner Standard. Diese Referenz ist nicht-sensitiv gegenüber Sauerstoff. Beide Fluorophore absorbieren Licht derselben Wellenlänge (540 nm) und emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlänge (650 bzw. 590 nm). Die Sauerstoffsensitivität der Fluoreszenz des Indikator-Sensors ist auf ein Quenching der Fluoreszenz durch den gelösten Sauerstoff zurückzuführen: Der Sauerstoff wird vom Grundzustand in den aktivierten Zustand überführt, da Energie vom Fluorophor aufgenommen wird. Dadurch gelangt das Fluorophor wieder in den Grundzustand mit verringerter Fluoreszenz. Zur Berechnung des Sauerstoffpartialdrucks wird zunächst der I_R -Wert mit Hilfe der Intensität I_{ind} des Sauerstoff-Sensors und der Intensität I_{ref} der Referenz berechnet:

$$I_R = \frac{I_{ind}}{I_{ref}}$$

Der Sauerstoffpartialdruck, d. h. die Sauerstoffkonzentration als Prozentsatz der Luftsättigung, ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$pO_2 = 100 \frac{\left(\frac{k_0}{IR} - 1 \right)}{\left(\frac{k_0}{k_{100}} - 1 \right)}$$

Die Werte k_0 und k_{100} sind Kalibrierungswerte der 2-Punkt-Kalibrierung: Sauerstoff-freies Wasser (k_0) und Sauerstoff-gesättigtes Wasser (k_{100}).

Zur Durchführung des Respirationstests wurden OP96U-Oxoplates (96 Well) mit U-förmigem Boden der Firma PreSens verwendet. Pro Well wurden $1,8 \times 10^7$ Sphäroplasten in 125 μ l Inkubationspuffer (Punkt 2.5.5) mit jeweils 75 μ l B88-Puffer (mit 0,8 M Sorbitol und 10 % Glycerin) als Pufferkontrolle oder der zu untersuchenden Probe (Kar2 in B88-Puffer) gemischt. Von allen Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 30 °C wurden die Kalibrierungslösungen k_0 und k_{100} in Dreifachbestimmung aufgetragen. Die äußeren Wells enthielten nur H₂O dest. als Kontrollwerte, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Die Messung wurde in einem Fluoreszenzreader (Fluoroskan Ascent, Labsystems) bei 37 °C, 120 rpm, Schütteldurchmesser 2 mm, mit zwei Filterpaaren durchgeführt: Filterpaar 1: 540/650 nm, Filterpaar 2: 540/590 nm. Innerhalb von 16 h wurden 48 Messungen vorgenommen. Der Sauerstoffpartialdruck konnte anhand der obigen Formel für jeden Messpunkt berechnet werden.

2.5.7. Zellfraktionierung

Lysepuffer

Sorbitol	200 mM
Hepes	20 mM
Kaliumacetat	50 mM
EDTA	2 mM

Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid auf 7,0 eingestellt. Kurz vor Gebrauch wurden 40 μ l/ml Protease-Inhibitor-Stammlösung zugesetzt.

Protease-Inhibitor-Stammlösung

Eine „Complete Protease-Inhibitor Cocktail“-Tablette (Roche) wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20 °C gelagert.

Zur subzellulären Toxinlokalisierung wurde eine 200 ml *S. cerevisiae* Kultur bei Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet (1×10^7 Zellen/ml) und sphäroplastiert (Punkt 2.5.5). Die Zellfraktionierung wurde in Anlehnung an Eisfeld *et al.* (2001) und Seaman *et al.* (1998) durchgeführt: Die Sphäroplasten wurden nach dem letzten Waschschrift in 10 ml Inkubationspuffer aufgenommen und mit 2 ml K28-Konzentrat inkubiert (90 min, 20 °C, 60 rpm). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen, um nicht aufgenommenes Toxin zu entfernen (10 min, 2.000 rpm, 4 °C). Zum Zellaufschluss wurden die Sphäroplasten in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und in einem Glas-Dounce-Homogenisator mit ca. 20 Hüben auf Eis aufgeschlossen. Die niedrige Osmolarität des Lysepuffers im Vergleich zum Inkubationspuffer trägt zusätzlich zur Lyse der Sphäroplasten bei. Durch das Auf- und Abbewegen des Pistills kommt es zu Kombination von Druck- und Scherkräften, so dass die Zellen aufgeschlossen werden, die Organellen jedoch intakt bleiben. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch kontrolliert und bei Bedarf wiederholt. Die folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt und die Proben auf Eis gelagert bzw. bei -20 °C eingefroren. Das Lysat wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert, so dass das Pellet P1 mit Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen erhalten wurde. Der Überstand wurde 15 min bei 13.000 x g zentrifugiert, wobei Membranfragmente der Plasmamembran, Golgi- und ER-Membranen sedimentieren (Pellet P13). Der Überstand wurde schließlich in einer Ultrazentrifuge (Optima MAX, Beckman Coulter; Rotor: MLS 50) 60 min bei 100.000 x g abzentrifugiert. Das resultierende Pellet, P100, beinhaltet die Endosomen und Vesikel. Der Überstand, die zytosolische Fraktion (S100), wurde mit 70 % Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden 30 min bei 16.000 x g, 4 °C, zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Zur SDS-PAGE wurden die Pellets in H₂O dest. mit Protease-Inhibitor (eine „Complete Protease-Inhibitor Cocktail“-Tablette (Roche) in 50 ml H₂O dest. gelöst (\cong H₂O dest. PI)) aufgenommen. Die genauen Volumina sowie die Probenvorbereitung zur SDS-PAGE sind Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9: Zellfraktionierung – Probenvorbereitung zur SDS-PAGE. Angegeben sind die Volumina zum Lösen der Pellets sowie das Probenvolumen und die entsprechende Menge an SDS-Probenpuffer.

Fraktion	Volumen zum Resuspendieren	Probenvolumen	SDS-Probenpuffer (3x)
Zelltrümmer P1	-	10 µl	20 µl
Membranen P13	70 µl H ₂ O dest. PI	20 µl	10 µl
Vesikel P100	ca. 50 µl Rückfluss	20 µl	10 µl
Zytosol S100	150 µl H ₂ O dest. PI	20 µl	10 µl

2.5.8. Toxinaufnahmestudien

Die Aufnahme von K28 durch sphäroplastierte Hefezellen wurde in Anlehnung an eine von Heiligenstein *et al.* (2006) beschriebene Methode untersucht. Dabei kann indirekt die Toxinbindung an Sphäroplasten sowie die anschließende Toxinaufnahme durch Bestimmung der Restmenge des Toxins im zellfreien Überstand untersucht werden. Dazu wurden 100 ml einer *S. cerevisiae* Kultur in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml) geerntet. 1×10^9 Zellen wurden wie unter Punkt 2.5.5 beschrieben sphäroplastiert und mit Inkubationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 2,5 ml Inkubationspuffer aufgenommen und je 200 µl Zellsuspension mit 200 µl K28wt Konzentrat, welches durch Zugabe von 0,8 M Sorbitol osmotisch stabilisiert wurde, gemischt. Zur Toxin-Stabilitätskontrolle wurden 200 µl K28wt-Konzentrat mit 200 µl Inkubationspuffer versetzt. Die Proben wurden bei 20 °C und 70 rpm bis zu 4 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots zentrifugiert (2.000 rpm, 20 min, 4 °C) und der zellfreie Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die im Überstand verbliebene Toxinmenge wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot bestimmt.

2.5.9. Inkubation mit fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten

Zur Fluoreszenzmikroskopie der Toxinaufnahme wurden 100 µl einer frischen *S. cerevisiae* Übernacht-Kultur oder 200 µl in der logarithmischen Wachstumsphase (1×10^7 Zellen/ml) befindliche Zellen geerntet (5 min, 8.000 rpm), mit 100 µl Inkubationspuffer (Punkt 2.5.5) gewaschen und in 25 µl Inkubationspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 25 µl des zu untersuchenden Toxinkonzentrates erfolgte die Inkubation in der Regel bei 20 °C und 60 rpm im Dunkeln. Nach 2 h wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen, im Rückfluss resuspendiert und zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

Wurden sphäroplastierte Zellen (Punkt 2.5.5) zur Inkubation verwendet, musste das Toxinkonzentrat durch Zugabe von 0,8 M Sorbitol osmotisch stabilisiert werden. Die Inkubation erfolgte analog dem oben beschriebenen Protokoll, wobei die Zentrifugationsschritte lediglich bei 2.000 rpm und 4 °C durchgeführt wurden.

Die Inkubationsbedingungen wurden hinsichtlich der Temperatur, Dauer und Pufferzusammensetzung variiert. Des Weiteren wurde ein Inkubationsprotokoll nach Toshima *et al.* (2006) durchgeführt, welches als Endozytose-Assay von fluoreszenzmarkiertem alpha-Faktor beschrieben ist. Der pH-Wert der verwendeten Lösungen wurde dabei auf 4,7 eingestellt.

2.5.10. Zellwand-Färbung (Calcofluor White)

Die Zellwand der Hefe *S. cerevisiae* ist aus einem Polysaccharid/Proteoglykan-Netzwerk aufgebaut, welches zu 60 % aus Glukan besteht. Neben β -1,3-D-Glukanpolymeren enthält sie noch β -1,6-D-Glukan, Mannoproteine und zu einem geringen Anteil Chitin. Die Stabilität der Zellwand wird durch das dicht gepackte fibrilläre Netzwerk aus Glukan und eingelagerten Chitin fibrillen gewährleistet (Zlotnik *et al.*, 1984, Cid *et al.*, 1995). Zur Färbung der Zellwand wird Calcofluor White verwendet, was irreversibel an Chitin bindet. Aufgrund des hohen Chitingehalts der Sproßnarben werden diese besonders stark gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff hat ein Anregungsmaximum 385 nm und ein Emissionsmaximum von 430 nm. Die Färbung wurde in Anlehnung an Baggett *et al.* (2003) durchgeführt: 200 µl Zellen der logarithmischen Wachstumsphase oder nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem K28 wurden abzentrifugiert (1 min, 13.000 rpm) und gegebenenfalls mit H₂O dest. gewaschen. Sie wurden in 100 µl Calcofluor White-Lösung (1 µg/ml) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Inkubationspuffer oder H₂O dest. konnten die Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

2.5.11. FM4-64 Färbung

10x PBS

Natriumchlorid	1,5 M
Dinatriumhydrogenphosphat	0,1 M

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

Bei FM4-64 (N-N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)) pyridiniumdibromid, Molecular Probes) handelt es sich um einen amphiphatischen Fluoreszenzfarbstoff, welcher in wässriger Umgebung nicht fluoresziert (Betz *et al.*, 1996). Der Farbstoff inseriert in die äußere Lipidschicht der Plasmamembran und wird in der hydrophoben Umgebung fluoreszent. Das Anregungsmaximum beträgt 558 nm, das Emissionsmaximum 734 nm. Eine passive Diffusion durch die Membran wird durch den geladenen polaren Teil des Moleküls verhindert. Daher eignet sich FM4-64 sehr gut als Marker für den Endozytose-Weg: Zunächst wird die Plasmamembran gefärbt, dann Endosomen und schließlich die vakuoläre Membran (Baggett *et al.*, 2003). Zur FM4-64-Färbung wurden Hefezellen der logarithmischen Wachstumsphase (1×10^7 Zellen/ml) geerntet (8.000 rpm, 5 min) und in PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf Concanavalin A-beschichtete Objektträger (2 mg/ml) aufgetropft. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurden sie mit 40 μ l PBS gewaschen und mit 40 μ l PBS-Lösung mit 8 μ M FM4-64 für 90 s gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mikroskopiert.

2.5.12. SNAP-Tag-Markierung

Das SNAP-Tag ist eine Variante des DNA-Reparaturproteins O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT). Das Enzym reagiert spezifisch, schnell und irreversibel mit Benzylguanin und dessen Derivaten, was zu einer kovalenten Markierung des SNAP-Tags mit einer synthetischen Probe führt (Abb. 14). Das wildtypische humane Enzym AGT ist ein monomeres Protein von 207 Aminosäuren, wobei die 30 C-terminalen Aminosäuren deletiert werden können, ohne die Aktivität des Enzyms zu beeinträchtigen. Zudem wird so die Größe des Tags verringert, die damit bei ca. 20 kDa liegt. Die Reaktion von AGT-Fusionsproteinen mit Benzylguanin ist unabhängig von der Art der Markierung, so dass ein AGT-Fusionsprotein mit z. B. fluoreszenzmarkiertem Benzylguanin getaggt werden kann (Keppler *et al.*, 2003; Keppler *et al.*, 2004). Nicht membrangängige fluoreszenzmarkierte SNAP-Tag Substrate bieten die Möglichkeit nur solche AGT-Fusionsproteine zu detektieren, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind.

Zur SNAP-Tag Markierung von Hefezellen, die AGT-Fusionproteine exprimieren, wurde das „SNAP-Tag Kit“ von New England Biolabs genutzt. Das darin enthaltene nicht membrangängige SNAP-Tag Substrat ist mit Alexa-Fluor 488 gekoppelt. Hefezellen wurden unter induzierenden Bedingungen bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml) kultiviert, $1,5 \times 10^7$ Zellen geerntet und mit 200 μ l PBS/BSA (5 mg/ml BSA in 1x PBS, Punkt 2.5.11) gewaschen (5 min, 8.000 rpm). Die Zellen wurden in 20 μ l SNAP-Surface-Lösung (SNAP-Surface Alexa Fluor Stock-Lösung (1 mM in DMSO) 1 : 200 verdünnt in PBS/BSA) aufgenommen und 40 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS/BSA gewaschen (5 min, 8.000 rpm) und im Rücklauf des letzten Waschschritts resuspendiert. Zur Mikroskopie wurde die Zellsuspension auf Concanavalin A-beschichtete Objektträger (2 mg/ml) aufgebracht und nach 15 min mit PBS/BSA gewaschen, um nicht immobilisierte Zellen zu entfernen.

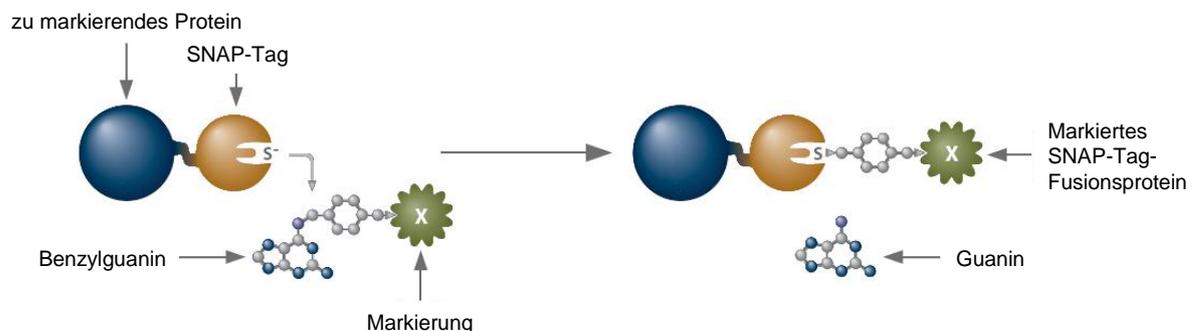


Abb. 14: SNAP-Tag Markierungsreaktion. Das zu markierende Protein ist mit dem SNAP-Tag, einer Variante der O^6 -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase, fusioniert und kann kovalent mit fluoreszenzmarkiertem Benzylguanin gekoppelt werden (New England Biolabs, verändert).

2.6. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie als spezielle Form der Lichtmikroskopie ermöglicht die Beobachtung von fluoreszierenden Molekülen, sogenannten Fluorochromen. Diese werden mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt und emittieren Licht einer größeren Wellenlänge. Diese Absorption von kurzwelligem Licht gefolgt von der Emission längerwelligem Lichts wird als Fluoreszenz bezeichnet. Durch die Absorption von Photonen erreichen fluoreszierende Moleküle ein höheres Energieniveau. Unter Energieverlust fallen sie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, wobei ein nur Teil der aufgenommenen Energie als Emissionslicht ausgesendet wird, so dass das emittierte Licht energieärmer ist und eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht besitzt, was als Stokes-Shift bezeichnet wird.

Ein Epifluoreszenzmikroskop nutzt als Lichtquelle eine Quecksilberdampflampe, wobei durch optische Filter die Anregung des Fluorochroms mit Licht einer bestimmten Wellenlänge gewährleistet wird. Das emittierte Licht wird im Strahlengang durch Farbteiler und optische Filter vom Anregungslicht getrennt.

Die Epifluoreszenzmikroskopie wurde am „Biozero BZ-8000“ (KEYENCE) durchgeführt. Zur Mikroskopie wurden die in Tab. 10 aufgeführten Filter verwendet. Aufnahmen von HeLa-Zellen wurden mit dem Objektiv PlanApo, 20x, NA: 0.75 (Nikon), Aufnahmen von Hefezellen mit einem Ölimmersionsobjektiv (PlanApo, VC, 100x, NA: 1.40 (Nikon)) angefertigt.

Tab. 10: Filtersets zur Epifluoreszenzmikroskopie (Biozero BZ-8000, KEYENCE).

Filter Anregung [nm]	Filter Emission [nm]	Dichroitischer Spiegel [nm]	Fluorophor
360/40	460/50	400	DAPI, Calcofluor White
480/30	510-	505	yEGFP, mTFP, Alexa Fluor 488
560/40	630/60	595	mCherry, FM4-64

2.6.1. Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden ursprünglich hauptsächlich kleine organische Farbstoffe verwendet, welche an Antikörper gegen das zu untersuchende Protein gekoppelt waren. Dies ermöglicht die Visualisierung der Proteinlokalisierung, jedoch muss zum Nachweis intrazellulärer Proteine eine Fixierung und Permeabilisierung der Zelle durchgeführt werden. Dazu werden Farbstoffe wie Alexa Fluor 488, eine photostabile und weniger pH-sensitive Weiterentwicklung des Fluoresceins, eingesetzt (Panchuk-Voloshina *et al.*, 1999). Des Weiteren existieren Fluorochrome, welche spezifisch Organelle und subzelluläre Strukturen erkennen. Dazu gehören der Zellwandfarbstoff Calcofluor White (Punkt 2.5.11) und der DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), der sich in die kleine Furche A-T-reicher DNA-Sequenzen einlagert und einen fluoreszierenden Komplex bildet. FM4-64 und „Cell mask deep red“ sind amphiphatische Moleküle, welche sich durch einen lipophilen Teil in Membranen einlagern, wobei durch einen geladenen hydrophilen Teil eine passive Diffusion durch die Membran verhindert wird. Sie werden zur Visualisierung der Plasmamembran und der Endozytose eingesetzt (Punkt 2.5.9). Die Verwendung von Fluoreszenzproteinen ermöglicht schließlich ein nicht invasives „live cell imaging“, da diese bereits auf genetischer Ebene mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert werden können. Der prominenteste Vertreter dieser Proteinfamilie, das grün fluoreszierende Protein

(GFP) der Qualle *Aequorea victoria* wurde 1962 von Shimomura *et al.* erstmals beschrieben und seither stetig weiterentwickelt, wozu auch yEGFP zählt. Diese für Hefe codonoptimierte GFP-Variante, die zusätzlich zwei Mutationen im Fluorochrom zur Verbesserung der Fluoreszenz trägt (Cormack *et al.*, 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit vereinfacht als GFP bezeichnet. Zu Kollokalisationsstudien wurde das rot fluoreszierende Protein mCherry gewählt, das durch gerichtete Evolution aus dem Protein DsRed aus *Discosoma sp.*, einer Seeanemone, erhalten wurde und dessen Absorptionsspektrum weniger Überlagerungen mit dem Emissionsspektrum von GFP aufweist (Shaner *et al.*, 2004). Zudem zeichnet es sich durch eine geringe pH-Sensitivität aus. Außerdem wurde die erste monomere Variante des tetrameren CFP („cyan fluorescent protein“) aus der Koralle *Clavularia* verwendet; eines der photostabilsten und hellsten Fluoreszenzproteine (Ai *et al.*, 2006). Die Absorptions- und Emissionsmaxima der in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzproteine, deren Absorptions- und Emissionsmaxima.

Fluoreszenzfarbstoff/Fluoreszenzprotein	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Alexa Fluor 488	488	519
Calcofluor White	385	430
Cell mask deep red	649	666
DAPI	365	450
FM4-64	558	734
GFP (yEGFP)	488	507
mCherry	587	610
mTFP	462	492

2.6.2. Quenching

Als Fluoreszenz-Quenching werden Prozesse bezeichnet, die zur Abnahme der Fluoreszenzintensität einer Probe führen. Der hydrophile Farbstoff Bromphenolblau kann zu einem Quenchen von grüner Fluoreszenz führen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einen Resonanz-Energie-Transfer (RET), eine Energieübertragung vom Fluorophor zu Bromphenolblau ohne direkte physikalische Interaktion. Dies wird durch eine teilweise Überlappung des Emissionsspektrums eines grünen Fluorophors (z.B. mTFP) mit dem Absorptionsspektrum von Bromphenolblau ermöglicht. Aufgrund seiner Hydrophilie ist

Bromphenolblau kaum membrangängig, daher kann kein Quenching erfolgen, wenn Bromphenolblau und das Fluorophor durch eine Membran getrennt sind. Bromphenolblau eignet sich demzufolge zum Quenchen extrazellulärer Fluoreszenz (Harata *et al.*, 2006). Zum Quenchen von K28-mTFP^{HDEL}-behandelten Hefezellen wurden diese nach Waschen in Inkubationspuffer (Punkt 2.5.5) mit 2 mM Bromphenolblau-Lösung aufgenommen. Zur Herstellung der Lösung wurde Bromphenolblau in H₂O dest. gelöst und nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert.

2.6.3. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation beruht auf einem „yeast-two-hybrid“-System, welches auf der *in vivo* Rekonstitution eines Fluoreszenzproteins aus seinen zwei nicht fluoreszierenden Teilen, welche mit den zu untersuchenden Interaktionspartnern fusioniert sind, basiert. Ursprünglich wurde dazu das gelb fluoreszierende Protein YFP verwendet (Hu *et al.*, 2002). Fan *et al.* beschrieben 2008 erstmals die Rekonstitution von mCherry in einem BiFC-System, wobei das Fluoreszenzprotein zwischen den Aminosäuren 159 und 160 in zwei Fragmente (MN und MC) geteilt war, die über eine Linker-Sequenz mit den potentiellen Interaktionspartnern (Fänger- und Beuteprotein) verbunden waren. Wurden beide Fusionsproteine koexprimiert, ermöglichte erst eine Interaktion von Fänger- und Beuteproteinen eine Rekonstitution des Fluorophors, dessen Fluoreszenz detektiert werden konnte. Dieses System konnte auch für die Hefe *S. cerevisiae* erfolgreich etabliert werden, wobei das Hsp40 Co-Chaperon Sis1p, welches Homodimere bildet, als Positivkontrolle verwendet wurde (Schäuble, 2008; Sha *et al.*, 2000).

2.6.4. Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die räumliche Auflösungsgrenze der konventionellen optischen Mikroskopie entspricht ungefähr der Hälfte der Wellenlänge des Lichtes, also ca. 200 nm für sichtbares Licht (400 - 750 nm). Das so genannte Abbe-Limit beschreibt die maximale Auflösung für ein Fluoreszenzmikroskop mit folgender Formel:

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

Wobei NA der numerischen Apertur ($NA = n \sin(\alpha)$; n = Brechungsindex des Immersionsmediums; α = halber Öffnungswinkel des Objektivs) entspricht. Die konfokale Mikroskopie erreicht eine um $\sim \sqrt{2}$ verbesserte Auflösung mit geringer „out-of-focus“

Fluoreszenz durch Einzel-Punkt-Anregung mittels eines Lasers und Detektion durch ein „pinhole“ (Lochblende), d. h. nur Signale aus einer Ebene werden vom Detektor, einer Photomultiplier-Einheit, erfasst. Es folgt ein Raster-Scan des gesamten Bildes, worin auch der Nachteil dieser Methode begründet liegt, die relativ lange Aufnahmedauer, die notwendig ist, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen (Garini *et al.*, 2005).

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde am cLSM 510 Meta (Zeiss) durchgeführt. Die Hefezellen wurden dazu auf Concanavalin A-beschichteten Objektträgern (2 mg/ml) immobilisiert. Die Aufnahmen wurden mit einem 100 x Objektiv EC Plan-Neofluar (NA= 1,3) in Ölimmersion durchgeführt. Die genauen Parameter sind Tab. 12 zu entnehmen.

Tab. 12: Parameter zur konfokalen Laserscanning Mikroskopie.

Fluorophor	yEGFP, mTFP	mCherry, FM4-64	BiFC (mCherry)
Laser (Anregungswellenlänge)	488 nm	543 nm	514 nm
Beamsplitter	488 HFT, 490 NFT	514 HFT, 545 NFT	515 HFT, 545 NFT
Filter	BP 500-530	LP 560	LP 560

2.6.5. „Structured Illumination“ Mikroskopie (SIM)

Die „Structured Illumination“ Mikroskopie erreicht eine Auflösung, welche über das Abbe-Limit hinausgeht. Die Probe wird mit mehreren interferierenden Lichtstrahlen angeregt. Dieses sinusförmige „Streifenmuster“ wird in fünf Stufen verschoben und in drei Stufen um jeweils 60 ° rotiert. Das emittierte Licht enthält die hochauflösende Bildinformation, ähnlich einem Moiré-Bild, welche zur Rekonstruktion des Bildes genutzt wird (Gustafsson *et al.*, 2000). Die Auflösung liegt im Bereich von 100 nm, was der zweifachen Auflösung eines herkömmlichen Fluoreszenzmikroskops entspricht. Die „Structured Illumination“ Mikroskopie wurde an einem Prototyp von Zeiss mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 Objektiv unter den in Tab. 13 aufgelisteten Parametern durchgeführt. Die „Zen 2009“-Software (Zeiss) wurde zur Aufnahme und Prozessierung der Bilder eingesetzt.

Tab. 13: Parameter zur „Structured Illumination“ Mikroskopie.

Fluorophor	mCherry	Cell mask deep red
Beamsplitter	405/561	635
Laser	561 nm	635 nm

Die Hefezellen wurden zur Mikroskopie auf Concanavalin A beschichteten Deckgläsern (2 mg/ml) immobilisiert. Zur Färbung der Plasmamembran wurde der Farbstoff „Cell Mask Deep Red“ (Molecular Probes) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Das amphiphatische Molekül besitzt einen lipophilen Teil zur Anlagerung an die Membran und den negativ geladenen hydrophilen Farbstoff zur Verankerung in der Plasmamembran.

2.6.6. TIRF-Mikroskopie

Die interne Total-Reflexionsfluoreszenzmikroskopie ermöglicht die spezifische Visualisierung membrannaher Prozesse und wurde 1981 erstmals von Axelrod beschrieben. Die Auflösung in z-Richtung von 100 nm geht über das Abbe-Limit hinaus, was durch eine Total-Reflexion des Anregungslichtes erreicht wird. Diese entsteht, wenn Licht von einem Medium mit höherem Brechungsindex (n), z. B. Glas, auf ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex, z. B. eine Zelle oder Wasser, in einem bestimmten Winkel trifft. Das Snelliussche Brechungsgesetz ($n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$) beschreibt das Verhalten des Lichtes an der Grenzfläche. Abhängig vom Einfallswinkel θ_1 und der Polarisation der einfallenden Lichtwelle wird das Anregungslicht unter einem bestimmten Winkel θ_2 gebrochen. Der kritische Winkel θ_c entspricht dem Winkel, beim welchem das Anregungslicht parallel an der Grenzfläche verläuft, wobei θ_2 90° beträgt. θ_c hängt vom Verhältnis der Brechungsindices der beiden Medien ab: $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ (Abb. 15). Übersteigt der Einfallswinkel θ_1 den kritischen Winkel θ_c , wird das Anregungslicht komplett reflektiert. Die Photonen dringen jedoch in geringem Maße in das wässrige Medium ein, wobei ein evaneszentes Feld erzeugt wird, dessen Intensität mit zunehmender Entfernung von der Grenzfläche exponentiell abnimmt; sie reicht abhängig von der Wellenlänge und θ_2 nur wenige 100 nm in das Medium mit geringerem Brechungsindex n_2 (Abb. 15, Toomre & Manstein, 2001).

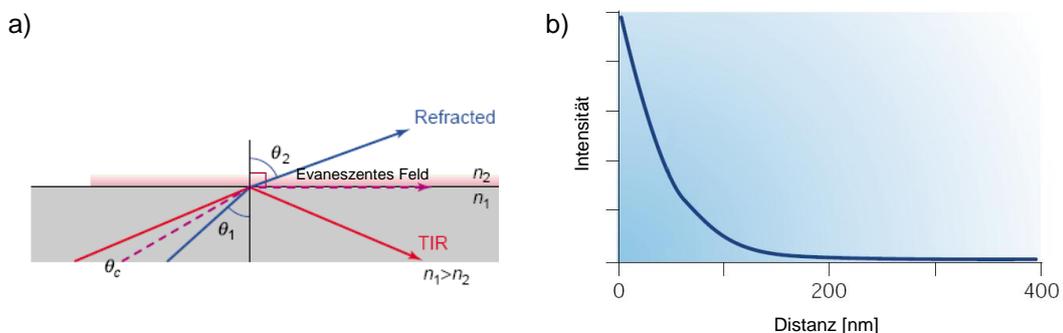


Abb. 15: Prinzip der TIRF-Mikroskopie. a) In Abhängigkeit vom Einfallswinkel θ_1 wird Licht einer bestimmten Wellenlänge beim Auftreffen auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices (n) reflektiert (TIR, totale interne Reflexion), wenn $n_1 > n_2$ und der Einfallswinkel θ_1 größer als der kritische Winkel θ_c . Entlang der Grenzschicht entsteht ein evaneszentes Feld. b) Die Intensität des evaneszenten Feldes nimmt exponentiell mit der Entfernung zur Grenzschicht ab (nach Toomre & Manstein, 2001; Steyer & Almers, 2001).

Die TIRF-Mikroskopie bietet neben einer hohen Auflösung in z-Richtung ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis, da nur Fluorophore an der Grenzschicht angeregt werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, Aufnahmen mit einer Geschwindigkeit von bis zu 200 Hz durchzuführen, da eine CCD („charge-coupled device“) Kamera verwendet wird. Im Gegensatz dazu wird während der konfokalen Laserscanning Mikroskopie die Probe Pixel für Pixel gescannt. Die TIRF-Mikroskopie erlaubt die Untersuchung von zellulären Prozessen in Plasmamembran-Nähe in Echtzeit, ohne dass oberflächennahe Signale durch Hintergrundstreulicht überdeckt werden (Toomre & Manstein, 2001; Steyer & Almers, 2001). Auch zur Untersuchung der Endozytose in *S. cerevisiae* wurde die TIRF-Mikroskopie eingesetzt, da kortikale Signale sonst durch die starke Fluoreszenz interner Strukturen überlagert werden (Kaksonen *et al.*, 2005).

Zur TIRF-Mikroskopie wurden die Hefezellen in PBS gewaschen (2 min, 10.000 rpm) und auf Concanavalin A-beschichteten (2 mg/ml) Deckgläsern immobilisiert. Das TIRF-Mikroskop war mit einer Quant EM Kamera (Roger Scientific GmbH), einem 100x/1.45 NA Plan Achromat TIRF Objektiv (Olympus Optical), einem TILL-TIRF Kondensator (TILL-Photonics) und einem multi-line Argon Laser 1885F12 (Spectra-physics, Mountain View, CA, USA, 488 nm) ausgestattet. Die Pixelgröße betrug 160 nm. Die experimentelle Eindringtiefe von 245 ± 53 nm (SD, n=6) wurde mit 1 μ m großen fluoreszierenden Beads (Invitrogen) nach Keyel *et al.* (2004) und Fish (2009) bestimmt. Zur Untersuchung der Vesikelmobilität wurden zweiminütige Aufnahmen mit einer Geschwindigkeit von 10 Hz durchgeführt.

2.6.6.1. Mobilitätsanalyse

Zur Analyse der Mobilität von Erd2-GFP wurden zunächst je Video zwölf bzw. zehn Zellen ausgewählt, wobei sowohl die Hellfeld- als auch die TIRF-Bilder zur Beurteilung der Zellgüte herangezogen wurden (Programm „ImageJ“). Vitale Zellen, welche nicht überlappten, auf dem Deckglas immobilisiert waren und Signale für Erd2p-GFP zeigten, wurden anhand der ersten Aufnahme in TIRF sowie im Hellfeld ausgewählt und deren Position gespeichert.

Die weitere Analyse wurde mit der Software „Easy Track“ (entwickelt von Dr. Detlef Hof; basierend auf „Labview“, National Instruments) in Anlehnung an Nofal *et al.* (2007) und Pasche (2009) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Aufnahmen gemittelt und eine Region, welche nur Hintergrundfluoreszenz enthielt, ausgewählt. Diese wurde jeweils als Hintergrund abgezogen. Bis auf die zuvor ausgewählten Zellen wurden alle restlichen Bereiche geschwärzt, so dass diese bei der weiteren Analyse nicht berücksichtigt wurden. Zur Positionierung der Partikel wurde ein Schwellenwert ermittelt, wobei von einer minimalen Partikelgröße von drei Pixel ausgegangen wurde. Der Schwerpunkt der Pixel

über dem Schwellenwert bestimmte dabei die genaue Position. Wurden zwei Partikel nicht als getrennt erkannt, wurde manuell eine Trennlinie eingezeichnet. Das Tracking der Partikel erfolgte unter folgenden Bedingungen: Ein Partikel musste auf drei aufeinander folgenden Bildern mit maximal drei Pixel Abstand vorhanden sein, um als Trajektorie erkannt zu werden. Dabei war eine maximale Lücke von zehn Bildern möglich. Das Tracking wurde überprüft: Wurden Partikel aufgrund geringer werdender Intensität unterhalb des Schwellenwerts nicht als durchgehende Trajektorie erkannt, konnten sie nachträglich zu einer Trajektorie verbunden werden. Der letzte Schritt bildete die Feinpositionierung der Partikel nach dem Centroid-Prinzip, wobei sowohl das geometrische Zentrum des Partikels als auch die Intensität in einem Radius von drei Pixel berücksichtigt wurden. Die weitere Analyse wurde mit der Software „IGOR“ (WaveMetrics) durchgeführt.

Zunächst wurden unspezifische Trajektorien, welche nur aus Hintergrundrauschen bestanden, gelöscht. Anschließend wurde die „caging diameter“-Routine zur Mobilitätsanalyse verwendet. Der „caging diameter“ (CD) beschreibt die maximale Strecke, die ein Partikel in 1 s (entspricht zehn Bildern) zurücklegen kann, genauer die größte Distanz der momentanen Position des Partikels und allen in der folgenden Sekunde eingenommenen Positionen. Diese zurückgelegte Strecke gibt dabei den CD-Wert der momentanen Position an. Abb. 16 a) verdeutlicht das Prinzip. Die Bewegung eines Partikel in einem bestimmten Zeitrahmen (dargestellt als Trajektorie in Abb. 16 b) wird durch den CD beschrieben (Abb. 16 c). Der CD wurde für alle Positionen des Partikels während der Aufnahme bestimmt, wobei für die letzten neun Positionen kein CD-Wert ermittelt werden konnte. Partikel mit einer Lebensdauer unter 1 s wurden nicht berücksichtigt.

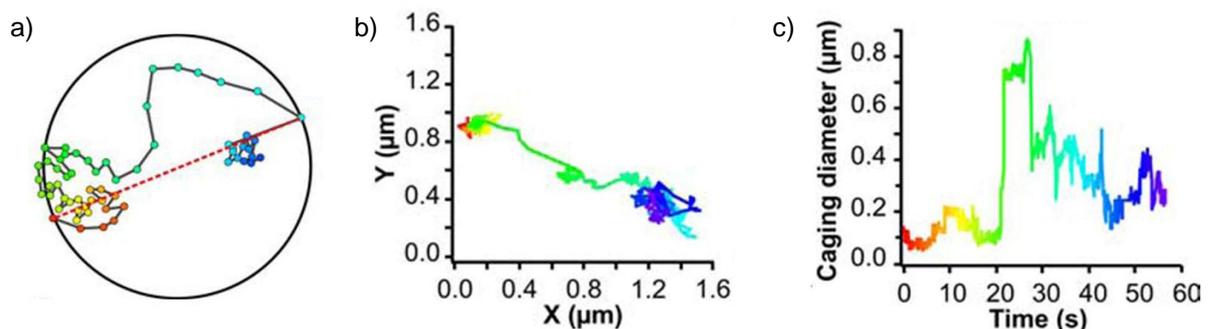


Abb. 16: Prinzip der „caging diameter“- Analyse. a) Der „caging Diameter“ (CD) beschreibt die maximale Strecke, die ein Partikel innerhalb 1 s zurücklegt. Die Analyse startet am roten Punkt und endet am dunkelblauen Punkt. Die rote Linie stellt die maximal zurückgelegte Distanz innerhalb der Zeiteinheit dar. Die Bewegung des Partikels, dargestellt als Trajektorie in b) wird durch den CD (c) im zeitlichen Verlauf beschrieben (nach Nofal *et al.*, 2007).

Die Häufigkeitsverteilung der CD, die für ein Video (10 - 12 Zellen) bestimmt worden war, wurde auf die Gesamtzahl der CD normiert und in einem Histogramm dargestellt. Von jedem untersuchten Hefestamm wurden zehn bis 15 Videos aufgenommen. Von den erhaltenen Histogrammen wurde der Durchschnitt ermittelt und zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Ergab sich beim Vergleich dieser Daten ein deutlicher Unterschied für die Bewegung von Erd2-GFP in zwei verschiedenen Hefestämmen, wurde ein kumulatives Histogramm erstellt. Der CD-Wert, der von 50 % aller CD-Werte erreicht wurde, wurde ermittelt und konnte zum Vergleich und einer statistischen Absicherung (t-Test) der Ergebnisse herangezogen werden.

2.6.6.2. Analyse der Partikel-Verweildauer an der Plasmamembran

Zur Bestimmung der Verweildauer von Erd2-GFP wurde die Anzahl der Bilder, auf denen ein Partikel vorhanden war, durch zehn geteilt und prozentual in Zehner-Gruppierungen in einem Diagramm dargestellt.

2.7. Säugerzellspezifische Methoden

2.7.1. Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl einer Zellkultur zu bestimmen, wurden HeLa-Zellen zunächst durch Trypsin-Behandlung von der Kulturflasche abgelöst (Punkt 2.3.5) und in Medium aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 10 µl in eine Neubauer Zählkammer gefüllt (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²). Vier Quadrate wurden gezählt und der Mittelwert zur Berechnung der Zellzahl nach folgender Formel eingesetzt: Mittelwert x 10⁴ = Zellen/ml.

2.7.2. Vorbereitung zur Fluoreszenzmikroskopie

Sollten HeLa-Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden, wurden runde Deckgläser (Ø 1 cm) in Multiwell-Platten gelegt und die Zellsuspension mit definierter Zellzahl zugegeben. Am Folgetag waren die Zellen an das Deckglas adhärirt und konnten mit Mounting-Medium (mit DAPI, Vectashield) auf den Objektträger aufgebracht und zur Mikroskopie verwendet werden.

2.7.3. Inkubation mit fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten

Zur Untersuchung der Bindung und Aufnahme von fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten und entsprechender Kontrollen wurden HeLa-Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und 400 µl PBS mit 100 µl des zu untersuchenden Toxinkonzentrates zugegeben und die Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Pufferkontrolle wurden 100 µl eines 10 mM Citrat-Puffers pH 5,3 verwendet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zur Fluoreszenzmikroskopie oder zum Zellaufschluss eingesetzt. Alternativ wurde im Anschluss ein Trypsinverdau durchgeführt, um extrazelluläres Toxinkonzentrat zu entfernen. Dazu wurden 200 µl einer 0,25 % Trypsin-Lösung (in PBS) auf die Zellen gegeben und der Verdau nach 30 min Inkubation im Brutschrank durch Zugabe von Medium (DMEM ohne Phenolrot) gestoppt. Bevor die Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt wurden, erfolgte ein Waschschrift mit PBS.

2.7.4. Zellaufschluss

RIPA-Puffer

Tris	50,0	mM
Natriumchlorid	150,0	mM
EDTA	1,0	mM
IGEPAL	1,0	%
Natriumdesoxycholat	1,0	%
SDS	0,1	%

Zum Zellaufschluss von HeLa-Zellen wurde ein Protokoll nach Helenius *et al.* (1979), welches RIPA-Puffer zur Zellyse nutzt, verwendet. Dazu wurden 1×10^6 Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der Kulturschale gelöst (Punkt 2.3.5). Die Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit PBS gewaschen (1 min, 13.000 rpm). Der Überstand des letzten Waschschrifts wurde verworfen und die Zellen im doppelten Rückflussvolumen RIPA-Puffer aufgenommen. Dem Puffer wurden 5 µl einer Protease-Inhibitor-Lösung Stammlösung (eine „Complete Protease-Inhibitor Cocktail“-Tablette (Roche) wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20 °C gelagert) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, wobei er alle 10 min gevortext wurde. Nach einer einstündigen Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert.

2.8. Proteinbiochemische Methoden

2.8.1. SDS-PAGE

Tris-HCl/SDS

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

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,45 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

3x SDS-Probenpuffer

H ₂ O steril	4,0 ml
0,5 M Tris-HCl-Lösung, pH 6,8	2,0 ml
Glyzerin 96 %	2,4 ml
10 % SDS	1,0 ml
0,05 (w/v) Coomassie Brilliant Blue	0,4 ml

Zur Herstellung von reduzierendem Probenpuffer wurden 5 % Mercaptoethanol zugegeben.

5x Anodenpuffer

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

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,9 eingestellt.

5x Kathodenpuffer

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

Die Gel-Elektrophorese wird zur Analyse von Proteingemischen eingesetzt und ermöglicht eine schnelle Bestimmung des Molekulargewichtes. Bei der SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (PAGE) nach Shapiro *et al.* (1967) findet die Proteintrennung unter denaturierenden Bedingungen statt. Das im Probenpuffer und Gel enthaltene anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. Die entstehenden SDS-Protein-Komplexe haben ein konstantes Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen). Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine haben somit vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften und können aufgrund ihres Molekulargewichts separiert werden. Zur Reduktion von Disulfidbrücken kann Mercaptoethanol oder Dithiothreitol

zugegeben werden. Die zur Auftrennung der Proben verwendeten Polyacrylamidgele sind chemisch inert. Die Porengröße wird durch die Konzentrationen von Acrylamid und dem quervernetzenden Methylenbisacrylamid bestimmt. Die Polymerisation wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe bewegen sich zur Anode, wobei ihre Beweglichkeit direkt proportional zum Logarithmus ihrer Masse ist. In dieser Arbeit wurden 10%ige Tris/Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem verwendet (Schägger & von Jagow, 1987). Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurde ein diskontinuierliches System, bestehend aus Sammel- und Trenngel, verwendet.

Ansatz zur Herstellung von zwei Sammel- und Trenngelen:

Trenngel:

Rotiphoresegel 30 (Roth)	5,9 ml
Tris-HCl/SDS	5,0 ml
H ₂ O dest.	2,1 ml
79 % (v/v) Glycerin	2,0 ml
TEMED	25,0 µl
10 % (w/v) APS (frisch angesetzt)	80,0 µl

Sammelgel:

Rotiphoresegel 30 (Roth)	1,6 ml
Tris-HCl/SDS	3,1 ml
H ₂ O dest.	7,8 ml
TEMED	25,0 µl
10 % (w/v) APS (frisch angesetzt)	80,0 µl

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurde das 2-Propanol abdekantiert und das Sammelgel gegossen.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit dem halben Volumen an Probenpuffer gemischt und 5 min im Wasserbad aufgeköcht. Sollte das Gel nach der Elektrophorese zum Nachweis der Fluoreszenzproteine unter UV-Licht photographiert werden, wurde auf ein Aufkochen der Proben verzichtet. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden 7 µl Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Abb. 17) und je Geltasche bis zu 25 µl Probe aufgetragen. Zur Elektrophorese wurde das vertikale System „Mini-Protean II“ von BioRad verwendet. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde die Elektrophorese bei 80 V gestartet (15 min). Anschließend wurde die Voltzahl auf 120 V erhöht.

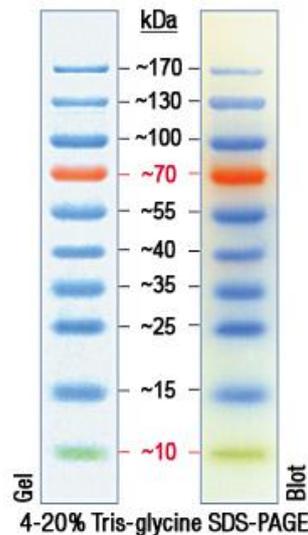


Abb. 17: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) zur Größenbestimmung der Proteine bei einer SDS-PAGE.

2.8.2. Coomassie-Färbung

Färbelösung

Methanol	30,0 %
Essigsäure	7,5 %
Coomassie-Brilliant-Blau R250	0,1 %

Entfärbelösung

Methanol	30,0 %
Essigsäure	7,5 %

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an basische Seitenketten der Aminosäuren anlagert und damit Proteine unspezifisch färbt. Er wird zum Färben von SDS-Gelen verwendet, wobei die Empfindlichkeit bei 200 - 400 ng liegt (Fazekas de St Groth *et al.*, 1963). Die Färbemethode mit kolloidalem Coomassie erreicht eine Nachweisgrenze von 20 - 50 ng (Neuhoff *et al.*, 1988), eine Modifikation dieser Methode kann sogar Proteine bis zu einer Menge von 1 ng detektiert (Dyballa & Metzger, 2009). Zur Coomassie-Färbung wurde das SDS-Gel nach Beenden der Elektrophorese in Färbelösung dreimal 30 s in der Mikrowelle erhitzt und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Färbelösung wurde abdekantiert und das Gel in Entfärbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfärbelösung wurde mehrfach gewechselt, bis die ungefärbte Polyacrylamidmatrix vollständig entfärbt war.

2.8.3. Silberfärbung

Fixierer

Methanol	50 % (v/v)
Eisessig	5 % (v/v)

Waschlösung

Methanol	50 % (v/v)
----------	------------

Sensibilisierungslösung

Natriumthiosulfat	0,02 %
-------------------	--------

Silbernitrat-Lösung

Silbernitrat	0,1 %
--------------	-------

Die Lösung wurde bei 4 °C abgedunkelt gelagert.

Entwickler

Natriumcarbonat	2,00 %
Formaldehyd	0,04 %

Reaktionsstopp

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

Die Silberfärbung ermöglicht die Detektion von Proteinen in SDS-Gelen mit hoher Empfindlichkeit. Silberionen bilden Komplexe mit den Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cysteinresten der Proteine, wobei die Silberionen (Ag^+) der Komplexe durch alkalisches Formaldehyd zu Silber (Ag) reduziert werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05 - 0,1 ng Protein pro Bande (Heukeshoven & Dernick, 1988). Die Färbung wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Sinha *et al.* (2001) durchgeführt: Das SDS-Gel wurde nach Beenden der Elektrophorese 20 min in Fixierer auf einem Tumbler inkubiert und anschließend 10 min mit Waschlösung gewaschen. Es folgte eine zehninminütige Inkubation in Sensibilisierungslösung. Das Gel wurde zweimal 1 min mit H_2O dest. gewaschen und mit Silbernitrat-Lösung 20 min bei 4 °C gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift, zweimal 1 min mit H_2O dest., wurde Entwickler zugegeben und bis zum Erscheinen der Banden unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit Reaktionsstopp beendet.

2.8.4. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden Proteine, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran übertragen und immunologisch nachgewiesen (Gershoni & Palade, 1983). Der Transfer der durch das SDS negativ geladenen Proteine auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran erfolgt elektrophoretisch. Die durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisierten Proteine können mit entsprechenden Protein-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Vor Zugabe der Antikörper erfolgt ein Blocking-Schritt, um freie Bindestellen der Membran mit (für den Antikörper nicht erkennbaren) Proteinen abzusättigen und damit unspezifische Protein-Antikörper Bindungen zu verhindern. Nach Hybridisierung der Membran mit dem primären Antikörper (gegen das zu detektierende Protein gerichtet) und dem Auswaschen von überschüssigem Antikörper erfolgt die Hybridisierung mit einem sekundären Antikörper, der spezifisch Epitope des primären Antikörpers erkennt. Dieser ist in der Regel mit einem Enzym gekoppelt, welches die Nachweisreaktion katalysiert. Die verwendeten Sekundärantikörper waren an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Das Enzym oxidiert das Substrat, das zyklische Diacylhydrazid Luminol. Direkt nach der Reaktion befindet sich das oxidierte Luminol, ein intermediäres Zwischenprodukt, in einem angeregten Zustand. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert. Die Lichtemission kann aufgezeichnet werden. Eine Intensivierung der Lichtaussendung kann durch Zugabe von Phenol-Derivaten erreicht werden, die als Verstärker („enhancer“) fungieren (Thorpe *et al.*, 1985).

„Semi-dry-blotting“

Transferpuffer

Tris	3,03 g/l
Glyzerin	14,40 g/l
SDS	0,10 % (w/v)
Methanol	20,00 % (v/v)

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese in Transferpuffer gewaschen, um Salze und Detergentien zu entfernen. Die PVDF-Membran (Roche) wurde kurz in 100%igem Methanol getränkt und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte während 90 min in einer „Trans-Blot[®]SD Electrophoretic Transfer Cell“ (BioRad) bei 50 mA pro Gel. Zwischen Membran und Elektrode bzw. Gel und Elektrode wurde jeweils ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier (3 mm, Biorad) gelegt.

ImmunodetektionWaschpuffer

10x TBS	10,00	% (v/v)
Tween 20	0,05	%

10x TBS

Tris	1	M
Natriumchlorid	1	M

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert

Blocking-Puffer

10x TBS	10,00	% (v/v)
Tween 20	0,05	% (w/v)
Magermilchpulver	5,00	% (w/v)

Nach dem „semi-dry-blotting“ wurde die PVDF-Membran eine Stunde oder über Nacht in Blocking-Puffer belassen. Der Primärantikörper wurde in Blocking-Puffer verdünnt auf die Membran gegeben. Dieser und alle weiteren Hybridisierungsschritte erfolgten bei 20 °C in einem Hybridizer (HB-1000 Hybridizer, UVP Laboratory Products). Nach 1 h wurde die Membran zweimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 h mit dem Sekundärantikörper, verdünnt in Blocking-Puffer, hybridisiert. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind Tab. 14 zu entnehmen. Vor Zugabe des Substrates wurde die Membran dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Je 200 µl der Luminol/Enhancer- und der Peroxid-Puffer-Lösung des „SuperSignal West Dura Trial Kit“ (Pierce) oder „Western Lightning Plus-ECL“ (Perkin Elmer) wurden gemischt und auf die abgetropfte Membran gegeben. Die Detektion der Lichtemission wurde mit Hilfe des „ChemiDoc XRS system“ der Firma Biorad durchgeführt. Bei schwachen Signalen erfolgte die Entwicklung mittels Röntgenfilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche), wobei die Membran über Nacht auf dem Film belassen wurde.

Tab. 14: Zur Immunodetektion eingesetzte Antikörper und deren Verdünnungen.

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-K28 (Kaninchen)	1 : 5.000	M. Schmitt
Anti-K28, dialysiert (Kaninchen)	1 : 1.000	M. Schmitt
Anti-GFP (Maus)	1 : 5.000	Roche
Anti- β -Aktin (Maus)	1 : 1.000	Abcam
Anti-DsRed (Kaninchen)	1 : 750	Clontech
Anti-Kar2p (Kaninchen)	1: 10.000	R. Schekman
Anti-Sec61p (Kaninchen)	1 : 5.000	R. Schekman
Anti-Pep12p (Maus)	1 : 200	Molecular Probes
Anti-Pfk1/2p (Kaninchen)	1 : 20.000	J. Heinisch
Anti-Kaninchen Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Ziege)	1 : 10.000	Sigma
Anti-Maus HRP Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Ziege)	1 : 13.333	Thermo Scientific

2.8.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Lösung wurde ein BCA (Bicinchoninsäure) Assay durchgeführt. Diese Methode kombiniert zwei Reaktionen: Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Diese werden zu Cu^+ -Ionen reduziert und bilden mit BCA einen intensiv violett gefärbten Komplex (Smith *et al.*, 1985). Das violette Reaktionsprodukt ist wasserlöslich und zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche über einen weiten Bereich (20 - 2.000 $\mu\text{g/ml}$) annähernd linear zur Proteinkonzentration ist. Die Proteinkonzentration wurde mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt. Als Eichsubstanz wurde BSA eingesetzt.

2.8.6. Zellaufschluss *E. coli*

Puffer D

Hepes pH 6,8	50,0	mM
Kaliumacetat	400,0	mM
Magnesiumacetat	5,0	mM
β-Mercaptoethanol	3,5	mM
Imidazol pH 7	2,0	mM

Protease-Inhibitor-Stammlösung

Eine Tablette „Complete EDTA-free Protease-Inhibitor Cocktail“ (Roche) wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20 °C gelagert.

Während des Zellaufschluss durch Ultraschall werden die Zellen durch auftretende Scherkräfte bei der Kavitation aufgeschlossen: Die erzeugten Druckwellen führen zur Bildung von Kavitationsblasen, welche bei Druckanstieg implodieren und hohe Temperaturen sowie Druckspitzen bewirken. Daher ist eine Kühlung der Probe besonders wichtig.

Der Zellaufschluss von *E. coli* durch Ultraschall wurde mit einem 2MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator durchgeführt. Das bei -20 °C gelagerte Zellpellet einer 0,5 l Kultur (Punkt 2.3.1) wurde auf Eis aufgetaut und in 5 ml Puffer D (mit 200 µl Protease-Inhibitor-Stammlösung) gelöst. Der Aufschluss erfolgte bei 20 microns für 15 s im Eiswasserbad, anschließend wurde die Probe für 30 s gekühlt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (15.000 rpm, 20 min, 4 °C) und der Überstand bis zur weiteren Reinigung auf Eis gelagert.

2.8.7. Affinitätschromatographie an Nickelsepharose

Puffer E 10

Hepes pH 6,8	20,0	mM
Kaliumacetat	1,0	M
Magnesiumacetat	5,0	mM
β-Mercaptoethanol	3,5	mM
Imidazol pH 7	10,0	mM
Triton X-100	0,1	%

Puffer E 25

Hepes pH 6,8	20,0	mM
Kaliumacetat	250,0	mM
Magnesiumacetat	5,0	mM
β -Mercaptoethanol	3,5	mM
Imidazol pH 7	25,0	mM

Puffer E 200/500

Hepes pH 6,8	20,0	mM
Kaliumacetat	250,0	mM
Magnesiumacetat	5,0	mM
β -Mercaptoethanol	3,5	mM
Imidazol pH 7	200,0/500,0	mM

Zur Affinitätschromatographischen Anreicherung von His-Kar2p-Fusionsproteinen wurde Ni-Sepharose verwendet. Diese besteht aus stark verknüpften Agarose-Beads, an welche eine Chelatgruppe immobilisiert wurde. An diese Chelatgruppe sind Ni^{2+} -Ionen gebunden, die zur Reinigung von His-getaggten Proteinen dienen: Das His-Tag besteht aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen und kann an den N- oder C-Terminus eines Proteins fusioniert werden. Das His-Tag bindet spezifisch an Ni^{2+} -Ionen des Säulenmaterials. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit Imidazol, das Histidin kompetitiv verdrängt (Hochuli *et al.*, 1988).

Die Affinitätschromatographie von His-Kar2p-Fusionsproteinen wurde in Anlehnung an Corsi und Schekman (1997) durchgeführt, welche zur Anreicherung von biologisch aktivem Kar2p beschrieben ist. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe eines Systems von Pharmacia bestehend aus Pumpe (LKB Pump P-1), Detektor (LKB Control Unit UV 1, Optical Unit UV 1, Conductivity Monitor) und Schreiber (LKB REC 102). Eine His Trap FF-Säule (5 ml, GE Healthcare) wurde mit Puffer D (Punkt 2.8.6) aquilibriert (fünf Säulenvolumen) und die Probe aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit Puffer E 10 und Puffer E 25 gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das Fusionsprotein wurde mit Puffer E 200 oder E 500 eluiert und die Säule mit Puffer E 500 gespült. Das Eluat wurde bis zur Umpufferung mittels Gelfiltrationschromatographie auf Eis gelagert.

2.8.8. Umpufferung

Umpufferung mit Zentrifugationseinheiten

Die Umpufferung kleinerer Volumina erfolgte durch Verdünnen der Probe mit dem gewünschten Puffer (fünf- bis zehnfaches Probenvolumen) und anschließendem Einengen über Vivaspin-Zentrifugationseinheiten (Sartorius) nach Herstellerangaben (8.000 x g, 4 °C), bis das ursprüngliche Probenvolumen erreicht war. Die Ausschlussgrenze wurde dem jeweiligen zu konzentrierenden Protein angepasst; sie sollte mindestens 50 % kleiner sein als das Molekulargewicht des Proteins.

Umpufferung durch Gelfiltrationschromatographie

Zur Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Das Säulenfüllmaterial einer Gelfiltrationssäule besteht aus Partikeln mit Poren definierter Größe, wobei große Moleküle nicht hinein diffundieren können und durch den Flüssigkeitsstrom an den Partikeln vorbeigeleitet werden. Kleine Moleküle jedoch können in die Poren eindringen und werden somit langsamer transportiert (Hagel *et al.*, 1989). Die Partikel bestehen aus hydrophilen Polymeren wie Dextran. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Säulenmaterial, Sephadex G-25 fine (Pharmacia), handelt es sich um Dextran, das durch Epichlorhydrin quervernetzt ist und Partikeldurchmesser von 20 - 80 µm aufweist. Das Material eignet sich besonders zur Entsalzung und Umpufferung. Die Gelfiltrationschromatographie wurde je nach Probenvolumen mit verschiedenen Säulen in einem System von Pharmacia (vgl. Punkt 2.8.7) durchgeführt. Bei Volumina bis 25 ml wurde eine 15 cm Säule mit 75 ml Inhalt (XK 26, Pharmacia) und einer Laufgeschwindigkeit von 4 ml/min verwendet. Größere Volumina wurden über eine Säule mit 250 ml Inhalt (XK 50, Pharmacia) und einer Laufgeschwindigkeit von 10 ml/min umpuffert. Die Proben wurden kurzfristig auf Eis oder längerfristig bei -20 °C gelagert.

Umpufferung von HisKar2

B88-Puffer (ohne Glyzerin)

Hepes	20,00	mM
Kaliumacetat	150,00	mM
Sorbitol	0,25	mM
Magesiumacetat	5,00	mM

Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Zwei Ansätze His-Kar2p-Präparation (aus je 0,5 l *E. coli*-Kultur) wurden gepoolt, nach der Affinitätschromatographie mittels Gelfiltration in B88-Puffer ohne Glycerin überführt und über Zentrifugationseinheiten (siehe oben, Vivaspin, Sartorius, Ausschlussgrenze 30 kDa) auf 3 ml konzentriert. Zur osmotischen Stabilisierung wurde eine Endkonzentration von 0,8 M Sorbitol eingestellt. Die Probe wurde sterilfiltriert, 10 % steriles Glycerin zugegeben und Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.8.9. Anionenaustauschchromatographie

Bindungspuffer

Piperazin pH 5,4	20 mM
------------------	-------

Elutionspuffer

Piperazin pH 5,4	20 mM
Natriumchlorid	500 mM

Die Anionenaustauschchromatographie basiert auf der Adsorption und der reversiblen Bindung eines negativ geladenen Moleküls an positiv geladene Gruppen, welche an der Gelmatrix immobilisiert sind. Der pH-Wert, bei dem ein Molekül keine Nettoladung besitzt, wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Bei pH-Werten oberhalb des pI ist das Molekül negativ geladen und kann daher an einen Anionenaustauscher binden. Der verwendete Puffer muss im Hinblick auf pH und Ionenstärke so gewählt werden, dass möglichst nur das zu reinigende Protein an die Säulenmatrix bindet. Die Bindung an die Matrix erfolgt über elektrostatische Interaktionen, welche abhängig von der Salzkonzentration des Puffers sind. Um Proteine von der Matrix zu lösen, wird sukzessive mit ansteigender Salzkonzentration eluiert. Zur Reinigung von K28-mCherry^{HDEL} (pI 4,8) wurde das Toxin-konzentrat zunächst in Bindungspuffer mittels Gelfiltrationschromatographie (Punkt 2.8.8) umgepuffert. Zur Anionenaustauschchromatographie wurde eine Hi Trap Q HP-Säule (5 ml, GE Healthcare) verwendet, welche „Q Sepharose™ High Performance“ als Säulenmatrix mit einer Partikelgröße von 34 µm enthält, woran die funktionellen Gruppen über chemisch stabile Ether-Bindungen immobilisiert sind. Die Chromatographie wurde an einem FPLC-System (Äkta Purifier, GE Healthcare) mit einem Fraktionssammler Frac950 (GE Healthcare) durchgeführt. Die Detektion erfolgte parallel bei 280 nm und bei 578 nm (UV900, GE Healthcare). Die Säule wurde mit Bindungspuffer äquilibriert und die Probe aufgetragen (15 ml). Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (Elutionspuffer). Die Flussrate betrug 5 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml.

2.8.10. Lyophilisierung

Bei der Lyophilisierung wird wasserhaltigem Material bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes das Wasser entzogen. Das Lyophilisat, ein trockenes Pulver, ist in sekundenschnelle rekonstituierbar. Der Prozess besteht aus drei Phasen: Zunächst wird die Lösung eingefroren, dann wird unter Vakuum das Wasser entfernt und schließlich während der Nach Trocknung das restliche Wasser der Probe zur gewünschten Restfeuchte entzogen. Zur Lyophilisierung von K28-mCherry^{HDEL}-Toxinkonzentraten wurde die Probe nach der Umpufferung in McIlvaine-Puffer bei -80 °C eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4 LD plus, Christ) getrocknet. Das Lyophilisat wurde bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

2.8.11. ATPase-Assay

Reaktionspuffer

Tris-HCl, pH 8	25,0	mM
Kaliumchlorid	100,0	mM
Magnesiumchlorid	5,0	mM
EDTA	0,1	mM
DTT	0,5	mM
BSA	0,5	µg/µl
ATP	2,0	mM

ATP wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

Lanzetta-Lösung

Lösung 1:

Malachitgrün	0,045	% (w/v)
--------------	-------	---------

Lösung 2:

Ammoniummolybdat in 4 N HCl	4,2	% (w/v)
--------------------------------	-----	---------

Drei Teile Lösung 1 wurden mit einem Teil Lösung 2 vermischt. Nach 2 h Rühren wurden pro 25 ml dieser Lösung 0,5 ml einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung zugegeben und die erhaltene Lösung durch einen Spritzenvorsatzfilter (Ø 0,2 µm) filtriert.

Citrat-Lösung

Trinatriumcitrat

34 % (w/v)

Zur Bestimmung der enzymatischen ATPase-Aktivität wurde die Menge an freigesetztem Orthophosphat kolorimetrisch gemessen. Das Verfahren wurde von Lanzetta *et al.* (1979) entwickelt und beruht auf der Bildung eines Komplexes aus Phosphat, Ammoniumheptamolybdat und Malachitgrün unter sauren Bedingungen, wobei die Zugabe von Natriumcitrat eine Stabilisierung des Komplexes bewirkt.

In Anlehnung an Turgay *et al.* (1997), Failer (2002) und Steel *et al.* (2004) wurden 10 µl der zu testenden Proteinlösung mit 10 µl Reaktionspuffer versetzt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160 µl Lanzetta-Lösung abgestoppt und zur Stabilisierung nach 1 min 20 µl Citrat-Lösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 655 nm gemessen. Zur Bestimmung der Orthophosphat-Konzentration wurden die erhaltenen Werte mit einer Dikaliumhydrogenphosphat-Eichreihe (0 - 10 nmol/100µl) verglichen.

2.9. Chemikalien, Enzyme und Kits

Die wichtigsten in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien sind in der folgenden Tab. 15 aufgeführt. Antikörper sind unter Punkt 2.8.4 gesondert aufgelistet.

Tab. 15: Die wichtigsten verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits mit Herstellerangabe.

Firma	Produkte
Appllichem, Darmstadt	X-Gal, T4-DNA-Ligase, IPTG
Difco, Detroit (USA)	Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate
Sigma, St. Louis (USA)	<i>Taq</i> -Polymerase, Acrylamid, HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper, Primer, Concanavalin A
Eurogentec, Seraing (Belgien)	Smart Ladder
Fermentas, St. Leon-Rot	RNAse, PageRuler Prestained Protein Ladder, Restriktionsenzyme, dNTPs
Millipore, Eschborn	Dialysefilter, Amicon Membran
Nalgene Cryoware, Rochester (USA)	Kryoröhrchen
Nunc, Rochester (USA)	96-well-Mikrotiterplatten
Presens, Regensburg	Oxoplates

Firma	Produkte
Bioline, Luckenwalde	HyperLadder
Pierce, Bonn	SuperSignal West Dura Trial Kit, BCA-Protein Assay Kit
Perkin Elmer, Waltham (USA)	Western Lightning Plus-ECL
Roche, Basel (Schweiz)	Restriktionsenzyme, PVDF-Membran, Expand High Fidelity PCR System, Complete Protease-Inhibitor-Cocktail, Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Anti-GFP Antikörper
Sartorius, Göttingen	Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten, Minisart Spritzenvorsatzfilter
Analytik Jena, Jena	innuPREP Plasmid Mini Kit
OMEGA bio-tek , Norcross (USA)	E.Z.N.A. ® Gel Extraction Kit
Invitrogen, Karlsruhe	TOPO TA Cloning Kit, pYES2.1 TOPO TA Expression Kit, <i>Pichia</i> Expression Kit, Cell mask deep red plasma membrane stain
New England Biolabs, Frankfurt	<i>K. lactis</i> Protein Expression Kit, SNAP-Surface Kit
Novagen, Darmstadt	pST-Blue Acceptor Kit
Biorad, München	Elektroporationsküvetten
GE Healthcare, München	Hi Trap Q HP Säule, His Trap FF Säule
Biozym, Oldendorf	Agarose
Difco, Detroit (USA)	YNB
Marcor, New Jersey (USA)	Agar, Trypton, Pepton, Hefeextrakt
Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe	Alle weitem Chemikalien
Thermo Scientific	HRP-gekoppelter Anti-Maus Antikörper

3. Ergebnisse

Das virale Killertoxin K28, ein Mitglied der A/B-Toxin-Familie, kann als Modell-Toxin zur Analyse des intrazellulären Toxintransportes herangezogen werden. Dabei sollten besonders die Endozytose und der retrograde Transport beleuchtet werden, da diese essentielle Prozesse zur Ausprägung der Toxinwirkung darstellen. Außerdem bietet dieses Modell-System die Möglichkeit, neue Komponenten der Endozytose und des retrograden Transports zu identifizieren sowie deren Ablauf zu analysieren. Die Untersuchungen sind in folgende Bereiche aufgeteilt:

Zunächst sollten biologisch aktive und fluoreszenzmarkierte Varianten des viralen A/B Toxins K28 in Hefe hergestellt werden, um mit deren Hilfe in lebenden Hefe- und Säugerzellen die Prozesse von Endozytose und intrazellulärem Toxintransport verfolgen und mechanistisch charakterisieren zu können. Dazu musste in einem ersten Schritt ein geeignetes Expressionssystem zur Herstellung von fluoreszierenden und biologisch aktiven Toxinvarianten etabliert werden. Die fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten wurden dann zu Inkubationsexperimenten mit Hefe- und Säugerzellen eingesetzt. Im Folgenden wurden die Lokalisation des K28-Rezeptors Erd2p an der Plasmamembran und deren physiologische Funktion sowie die an der K28-Endozytose beteiligten Proteine näher charakterisiert

3.1. Herstellung fluoreszenzmarkierter K28-Varianten

Erste Hinweise auf eine endozytotische Aufnahme und einen retrograden intrazellulären Transport von K28 in sensitiven Hefezellen konnten durch einen Screen von Deletionsmutanten nach K28-resistenten bzw. hypersensitiven Mutanten gewonnen werden (Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein, 2008); der genaue Mechanismus der K28-Endozytose sowie des retrograden Transportes wurde bisher noch nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde K28 daher mit einem Fluorophor markiert, um die Aufnahme und den intrazellulären Transport an lebenden Zellen verfolgen zu können. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Toxinaufnahme in Echtzeit beobachten zu können, was auch Untersuchungen zur Mobilität und Dynamik erlauben würde. K28 wurde dazu mit einem Fluoreszenzprotein markiert. Sowohl yEGFP als auch mCherry wurden an den C-Terminus der β -Untereinheit fusioniert, wobei das ER-Retentionssignal HDEL am C-Terminus des Fluoreszenzproteins lokalisiert war (Abb. 18). yEGFP, im Folgenden als GFP bezeichnet, ist eine für Hefe codonoptimierte GFP-Variante, die zusätzlich zwei Mutationen im Chromophor zur Verbesserung der Fluoreszenz trägt (Cormack *et al.*, 1997). mCherry entstand durch Weiterentwicklung von mRFP und zeichnet sich durch eine hohe Photostabilität aus (Shaner *et al.*, 2004, Shaner *et al.*, 2005).

Das K28-eigene Sekretionssignal, die prä-Region, wurde durch das Sekretionssignal des α -Mating-Faktors (MF) ersetzt, was in verschiedenen Hefegattungen eine effiziente Sekretion gewährleistet (Brake *et al.*, 1984; Murasugi & Tohma-Aiba, 2001; Chen *et al.*, 1992; Colussi & Taron, 2005). Dieses Signal wird im Sekretionsweg durch die Signalpeptidase sowie die Endopeptidase Kex2p abgespalten. Ebenso werden die K28-eigene Pro-Region sowie die γ -Untereinheit im Verlauf der Prozessierung durch Kex2p entfernt. Das C-terminale HDEL-Signal bleibt zunächst durch einen Argininrest maskiert. Dieser wird im späten Golgi durch die Carboxypeptidase Kex1p entfernt, so dass das ER-Retentionssignal demaskiert und eine Sekretion des Fusionsproteins ermöglicht wird.

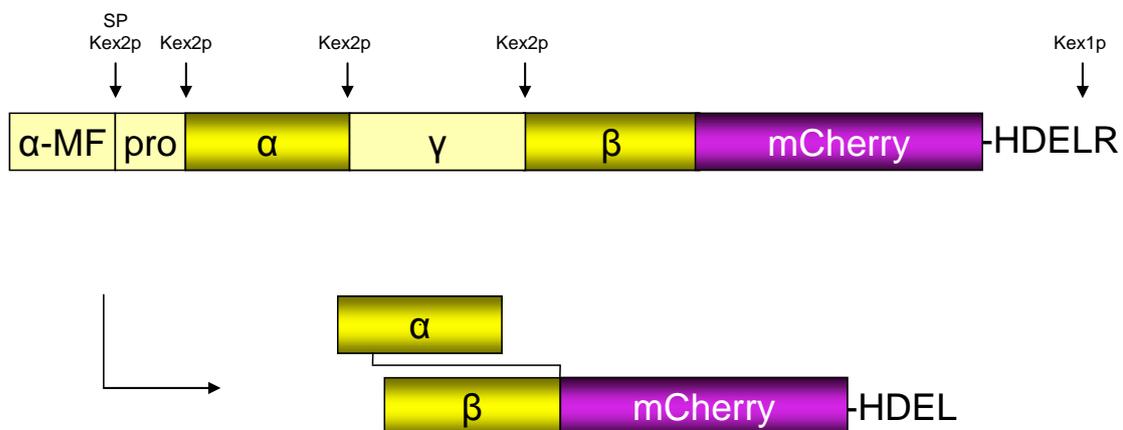


Abb. 18: Schematischer Aufbau des K28mCherry^{HDEL}-Konstruktes. Das Fusionsprotein enthält das Sekretionssignal des α -Mating Faktors (α -MF), welches durch die Signalpeptidase (SP) und die Endopeptidase Kex2p abgespalten wird. Im Sekretionsweg führt die Kex2p-vermittelte Prozessierung weiterhin zur Abspaltung der pro- und γ -Untereinheiten, wobei α und β durch eine neu gebildete Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die Carboxypeptidase Kex1p entfernt im späten Golgi den C-terminalen Argininrest und demaskiert somit das ER-Retentionssignal.

Zur Expression des fluoreszenzmarkierten Toxins wurden in dieser Arbeit zwei Hefegattungen, *Kluyveromyces lactis* und *Pichia pastoris* getestet. Beide werden zur Sekretion heterologer Proteine in großem Maßstab eingesetzt. Zunächst wurden vier Toxinvarianten konstruiert, um die zur Expression und Sekretion von biologisch aktivem, fluoreszenzmarkierten K28 optimalen Bedingungen zu bestimmen: K28-mCherry^{HDEL}, β -mCherry^{HDEL}, K28-GFP^{HDEL} sowie β -GFP^{HDEL} (Abb. 19). Da das α -MF-Sekretionssignal jeweils in den Expressionsvektoren enthalten war, wurde das Protoxin durch SOE-PCR mit mCherry oder GFP fusioniert und mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen.

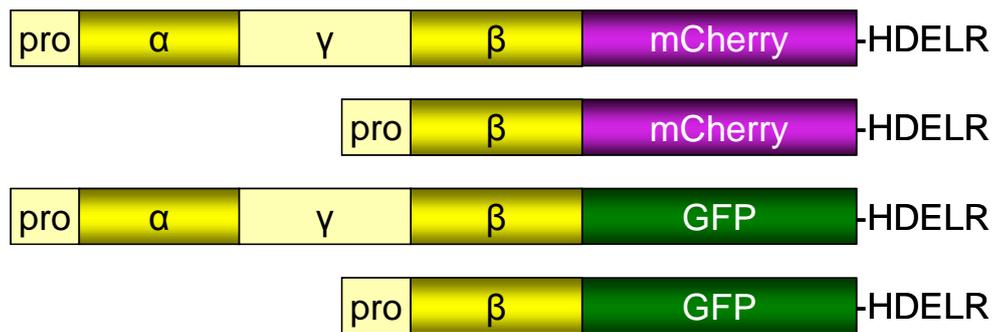


Abb. 19: Konstrukte zur Expression fluoreszenzmarkierter K28-Toxinvarianten. Sowohl das Protoxin als auch die Pro-Region fusioniert an die β -Untereinheit wurden mittels SOE-PCR an mCherry oder GFP (yEGFP) fusioniert. Die Konstrukte enthalten im 5'-Bereich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Xho*I sowie eine Kex2p-Schnittstelle. Im 3'-Bereich wurden Schnittstellen für *Not*I, *Sa*II und *Bgl*II angefügt.

3.1.1. Expression fluoreszenzmarkierter K28-Varianten in *K. lactis*

Die Milchhefe *Kluyveromyces lactis* wurde bereits erfolgreich zur heterologen Expression und Sekretion von über 40 Proteinen verwendet, darunter auch Chymosin, ein Labbestandteil, welches im industriellen Maßstab zur Käseherstellung produziert wird (Ooyen *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 1990). Zudem ist *K. lactis* in der Lage, wildtypisches K28-Toxin korrekt zu prozessieren und als biologisch aktives α/β -Heterodimer zu sezernieren. Die Sekretionseffizienz konnte dabei durch einen Austausch des K28-eigenen Sekretionssignals, der Prä-Region, durch das Sekretionssignal des α -Mating-Faktors aus *K. lactis* deutlich gesteigert werden (Walch, 2006).

Daher wurde zur Expression der fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten ebenfalls dieses Sekretionssignal genutzt. Es ist im Integrationsvektor pKLAC1 enthalten, in welchen die Konstrukte durch *Xho*I/*Not*I-Restriktion eingebracht wurden. Dabei musste die Kex2p-Schnittstelle rekonstituiert werden (im 5' Primer enthalten). Nach Linearisierung mit *Sac*II wurde die Expressionskassette in das Genom von *K. lactis* in den Promotor-Bereich des *LAC4*-Lokus integriert. Zur Überprüfung der Integration wurde eine „Colony“-PCR durchgeführt. Transformanten, welche eine Mehrfachintegration aufwiesen, wurden zur Induktion der Toxinexpression in Galaktose-haltigem SC-Medium kultiviert. Nach 96 h Induktion und 50facher Konzentration des Kulturüberstandes konnten die K28-mCherry^{HDEL} sowie K28-GFP^{HDEL} Fusionen im Western-Blot detektiert werden.

Abb. 20 a) zeigt beispielhaft den Nachweis von K28-mCherry^{HDEL}. Das Molekulargewicht der Fusionsproteine lag wie berechnet bei ca. 48 kDa (K28-mCherry^{HDEL}: 48,4 kDa). Eine zweite Bande von ca. 38 kDa entspricht der β -Variante, welche durch Spaltung der Disulfidbrücke entsteht. Unter reduzierenden Bedingungen war nur noch die β -Variante nachweisbar. Dies deutet auf eine korrekte Prozessierung der fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten in *K. lactis* hin. Eine Sekretion der β -mCherry-Fusionen konnte nicht nachgewiesen werden; die Zellen zeigten eine starke Fluoreszenz im Bereich der Vakuole (Abb. 20 b).

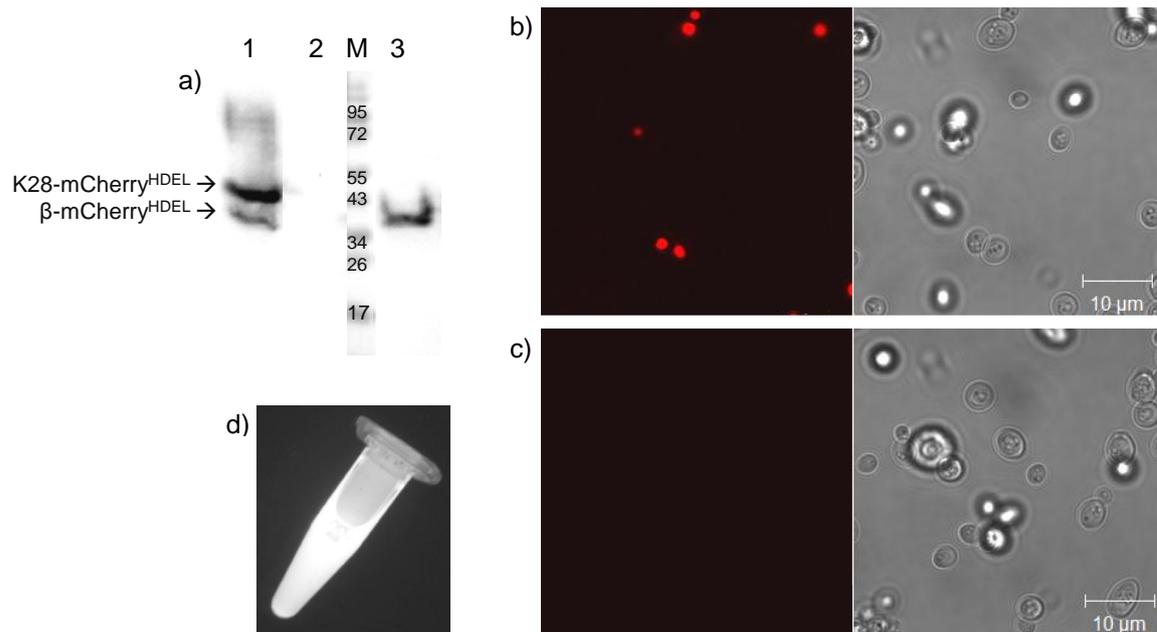


Abb. 20: Expression von mCherry-markierten K28-Toxinvarianten in *K. lactis*. a) Western-Analyse des 50fach eingegangenen Kulturüberstandes von *K. lactis* GG799 [pKLAC1 K28-mCherry^{HDEL}] nach 96 h Induktion (20 °C, 70 rpm). Die Detektion erfolgte durch anti-DsRed-Antikörper und HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper.

(1) GG799 [pKLAC1 K28-mCherry^{HDEL}] nicht reduzierend

(2) Negativkontrolle GG799 [pKLAC1]

(3) GG799 [pKLAC1 K28-mCherry^{HDEL}] reduzierend

(M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas)

b) und c) Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von β -mCherry^{HDEL}. *K. lactis* GG799 [pKLAC1 β -mCherry^{HDEL}] (b) sowie die Negativkontrolle GG799 [pKLAC1] (c) wurden 96 h in SC-gal-Medium, 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7, induziert. Die Aufnahmen erfolgten am LSM 510 META: 100fache Vergrößerung, average 1, pinhole 376 nm, Laser 543: 46,6 %. d) Fluoreszenz des 100fach konzentrierten Kulturüberstandes von *K. lactis* GG799 [pKLAC1 K28-mCherry^{HDEL}] nach 96 h Induktion (20 °C, 70 rpm) bei Anregung mit UV-Licht. Die Aufnahme erfolgte mit dem „ChemiDoc XRS system“ (Biorad).

Zum Nachweis der biologischen Aktivität wurde der konzentrierte Kulturüberstand im Agardiffusionstest gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d getestet. Eine Hemmhofbildung und eine damit verbundene Killeraktivität des Toxinkonzentrates konnte nicht beobachtet werden. Auch Sphäroplasten zeigten keine Sensitivität. Daher wurde *K. lactis* analog zur Herstellung von wildtypischem K28-Konzentrat in 12 l Galaktosehaltigem B-Medium zur Sekretion von K28-mCherry^{HDEL} kultiviert. Nach 96 h wurde der

Überstand abzentrifugiert und 800fach eingengt. Jedoch zeigte auch dieses K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat keine biologische Aktivität. Um zu untersuchen, ob die von *K. lactis* sezernierte K28-mCherry^{HDEL} Variante von Hefezellen aufgenommen werden kann, wurden verschiedene sensitive Hefestämme sphäroplastiert und mit K28-mCherry^{HDEL} inkubiert. Nach Zellaufschluss und differentieller Zentrifugation konnte das Toxin jedoch in keiner Fraktion nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten mit K28-mCherry^{HDEL} behandelte Zellen keine Fluoreszenz.

Parallel konnten die Kultivierungsbedingungen bezüglich der Fluoreszenz optimiert werden. Die Kombination aus SC-Galaktose-Medium, gepuffert mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7, 1 % „casaminoacids“ und 1 % Protease-Inhibitor-Stammlösung und die Kultivierung bei 20 °C führte zu einer starken Fluoreszenz der Toxinkonzentrate (Abb. 20 d). Insgesamt war *K. lactis* somit in der Lage, fluoreszierende und korrekt prozessierte K28-mCherry-Fusionen zu sezernieren. Da jedoch weder die Killeraktivität noch die K28-mCherry^{HDEL}-Internalisierung durch Hefezellen nachgewiesen werden konnten, wurde eine weitere Hefegattung zur Expression von biologisch aktiven K28-Toxinvarianten getestet.

3.1.2. Expression fluoreszenzmarkierter K28-Varianten in *P. pastoris*

Die Kultivierung der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* wurde in den 70er Jahren zur Produktion von „single cell protein“ (SCP) optimiert, so dass hohe Zelldichten von bis zu 130 g/l Trockengewicht erreicht wurden (Wegner, 1990). Hinzu kommt ein Vektorsystem zur heterologen Proteinexpression, welches die Herstellung großer Mengen an Fremdprotein ermöglicht (Dominguez *et al.*, 1998; Invitrogen). Bisher wurden mehrere hundert Proteine rekombinant in *P. pastoris* hergestellt, unter anderem auch das Killertoxin K28 (Eiden-Plach *et al.*, 2004). Dabei wurde das Sekretionssignal des α -Mating-Faktors aus *S. cerevisiae* am häufigsten zur effizienten Sekretion der heterologen Proteine verwendet (Cereghino & Cregg, 1999). Daher wurde zur Expression der fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten ebenfalls dieses Sekretionssignal genutzt. Die Signalsequenz ist im Integrationsvektor pPIC9 enthalten, so dass die Konstrukte durch *Xho*I/*Not*I-Restriktion in den Vektor eingefügt werden konnten. Die Kex2p-Schnittstelle war dabei in den 5'-Primer integriert. Nach Linearisierung mit *Sal*I erfolgte die Transformation durch Integration des Plasmids in das Hefegenom über den *his4*-Lokus. Zur Expression der Toxinvarianten wurden die beiden im *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) enthaltenen Stämme GS115 und KM71 getestet, welche sich vor allem in der Methanolverwertung, dem Mut-Phänotyp („methanol utilization“), unterscheiden. GS115 besitzt zwei funktionelle Alkoholoxigenasen, AOX1 und AOX2, was die Ausprägung des Mut⁺-Phänotyps ermöglicht. KM71 fehlt das AOX1-Gen, wodurch die verlangsamte Methanolverwertung (Mut^s, „methanol utilization slow“) bedingt ist. Zur

Kontrolle der genomischen Integration wurde eine „Colony“-PCR durchgeführt. Die Expression der Toxinvarianten wurde durch den Methanol-induzierbaren AOX1-Promotor gesteuert: Glukose reprimiert die Transkription des Zielgens, auch bei Vorhandensein von Methanol. Daher wurden positiv getestete Transformanten zunächst in Glycerin-haltigem BMG-Medium kultiviert und zur Induktion in Methanol-haltiges BMM-Medium (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6) überführt. Nach 120 h Induktion (220 rpm, 25 °C) wurden die Kulturüberstände 125fach konzentriert. Abb. 21 zeigt den Nachweis der Toxinvarianten K28-GFP^{HDEL}, β -GFP^{HDEL}, K28-mCherry^{HDEL} und β -mCherry^{HDEL} im Western-Blot. Das Molekulargewicht der Fusionsproteine lag bei ca. 48,5 kDa für die α/β -Fusionen; fehlt die α -Untereinheit, wie bei den β -Fusionen der Fall, oder durch Reduktion der Disulfidbrücke, verringert sich das Molekulargewicht um ca. 10,7 kDa. Das Molekulargewicht der im Western-Blot detektierten Banden stimmt mit den berechneten Größen überein, was auf eine korrekte Prozessierung der K28-Varianten im Sekretionsweg von *P. pastoris* hindeutet. Beide *P. pastoris* Stämme, GS115 und KM71 waren in der Lage, die Toxinvarianten zu sezernieren. Jedoch zeigte GS115 eine im Vergleich zu KM71 erhöhte Sekretion, was auch bereits beschrieben wurde (Diehl, 2008). Des Weiteren konnte wildtypisches, biologisch aktives K28-Toxin in GS115 produziert werden (Eiden-Plach *et al.*, 2004). Daher wurde dieser Stamm zur Sekretion der fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten genutzt.

Zur Produktion von biologisch aktivem Toxin wurden die Kultivierungsbedingungen hinsichtlich Medienzusammensetzung, Puffer, Temperatur, Induktionsdauer und Schüttelrate variiert. Im Agardiffusionstest konnte allerdings keine Killeraktivität nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine K28-mCherry^{HDEL} Variante mit K28-eigener Prä-Region exprimiert. Dazu wurde eine präproK28-mCherry-Fusion über *EcoRI/NotI*-Restriktion in den Vektor pPIC3.5 kloniert, welcher keine weitere Signalsequenz besitzt. Die Sekretionsstärke konnte im Vergleich zur α -MF-Signalsequenz nicht gesteigert werden, auch zeigte das erhaltene Toxinpräparat im Agardiffusionstest keine Killeraktivität. Daher wurde die Expression mit dem Sekretionssignal des α -MF fortgeführt und hinsichtlich der Fluoreszenz für K28-mCherry^{HDEL} optimiert: Die Kultivierung in BMM-Medium, gepuffert mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 0,5 % Protease-Inhibitor-Stammlösung, 20 °C und 80 rpm führte zu einer intensiven Fluoreszenz des Kulturüberstands (Abb. 22). Das erhöhte Molekulargewicht, welches anstatt bei ca. 48 kDa bei ca. 60 kDa lag, könnte auf die fehlende Denaturierung zurückzuführen sein, da die Proben zur Detektion der Fluoreszenz nicht erhitzt wurden.

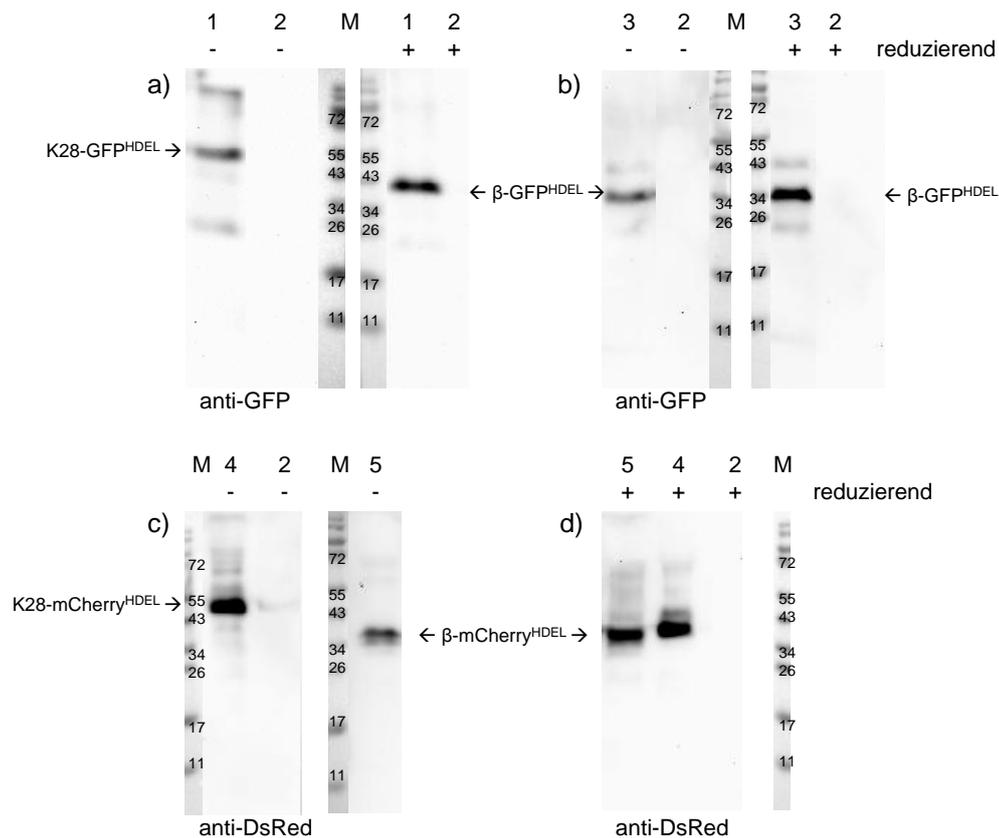


Abb. 21: Western-Analyse von *P. pastoris* Kulturüberständen nach Sekretion fluoreszenzmarkierter K28-Toxinvarianten. Zur Expression wurden die Zellen in BMM-Medium (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6) überführt. Die Detektion erfolgte durch anti-GFP Antikörper und HRP-gekoppelte anti-Maus-Antikörper bzw. anti-DsRed und HRP-gekoppelte anti-Kaninchen-Antikörper. **a)** uneingeengter Kulturüberstand nach 120 h Induktion (30 °C, 220 rpm). **b)** bis **d)** 125fach konzentrierter Kulturüberstand nach 120 h Induktion (25 °C, 220 rpm)

- (1) GS115 [pPIC9 K28-GFP^{HDEL}]
- (2) Negativkontrolle GS115 [pPIC9]
- (3) GS115 [pPIC9 β-GFP^{HDEL}]
- (4) GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}]
- (5) GS115 [pPIC9 β-mCherry^{HDEL}]
- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas)

Die fehlende biologische Aktivität der fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten könnte durch die pH-Sensitivität des Toxins bedingt sein. Wurde BMM-Medium mit Kaliumphosphatpuffer pH 6 verwendet, kam es während der Kultivierung zu einem Abfall des pH auf 3,3 bis 3,6. Kaliumphosphatpuffer pH 7 konnte den pH-Wert stabil bei 6,5 bis 7 halten. Das pH-Optimum von K28 liegt jedoch mit 4,7 außerhalb des Puffer-Bereichs. Auch die Verwendung von Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,7 führte nicht zu einer Stabilisierung des pH-Wertes. Folglich konnte durch Kultivierung von GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}] im Schüttelkolben zwar fluoreszierendes und korrekt prozessiertes K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat erhalten werden, Killeraktivität wurde jedoch nicht nachgewiesen.

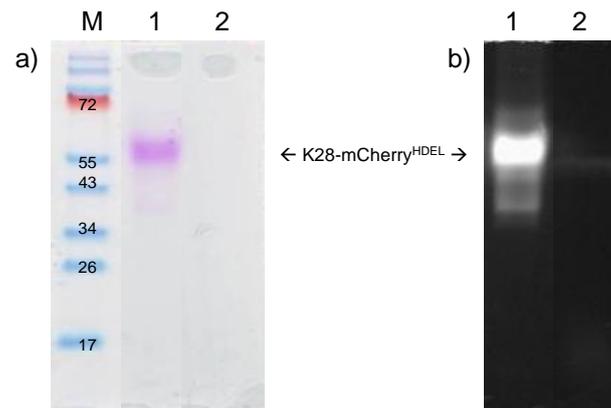


Abb. 22: Fluoreszenz von K28-mCherry^{HDEL}. *P. pastoris* GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}] wurde in BMM-Medium, gepuffert mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 0,5 % Protease-Inhibitor-Stammlösung, bei 20 °C, 80 rpm, 120 h induziert. Der 100fach konzentrierte Kulturüberstand der nicht erhitzten Probe wurde im SDS-Gel aufgetrennt (a) und unter UV-Licht dokumentiert (b).

- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas)
 (1) GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}]
 (2) Negativkontrolle GS115 [pPIC9]

3.1.2.1. Fermentation von *P. pastoris*

Die Produktion großer Mengen an heterologem Protein in *P. pastoris* im Schüttelkolben gestaltet sich durch Limitierung des Volumens, des Sauerstofftransfers, der Substratzugabe und der fehlenden Möglichkeit der Überwachung der Parameter sehr schwierig (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Um konstante Kulturbedingungen, vor allem hinsichtlich des pH-Wertes, gewährleisten zu können, wurde *P. pastoris* zur Sekretion der Toxinvarianten im Fermenter kultiviert (Punkt 2.5.3). Ab dem Zeitpunkt der Induktion durch Methanolzugabe wurde die Temperatur auf 20 °C gesenkt, was dem Temperaturoptimum von K28 entspricht. Der pH-Wert wurde durch automatische Zugabe von Ammoniak konstant auf einen Wert von 5,3 eingestellt. Bei diesem pH sollte sowohl die Aktivität von K28 als auch der Fluoreszenzproteine nicht beeinträchtigt sein. Beispielhaft ist der Verlauf der Fermentation von GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}] in Abb. 23 dargestellt: Das Wachstum der Zellen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) kontrolliert, wobei Zelldichten von einer OD₆₀₀ > 700 erreicht wurden. Die Zunahme an K28-mCherry^{HDEL} im Kulturüberstand konnte im SDS-Gel anhand der Fluoreszenz sowie durch Coomassie-Färbung bestätigt werden. Zusätzlich zu der erwarteten Bande bei 48,4 kDa, welche K28-mCherry^{HDEL} entspricht, konnte eine weitere Bande bei ca. 38 kDa detektiert werden. Diese stellt β-mCherry^{HDEL} dar, welches durch eine Spaltung der Disulfidbrücke zwischen α und β im Verlauf der Fermentation entstanden ist.

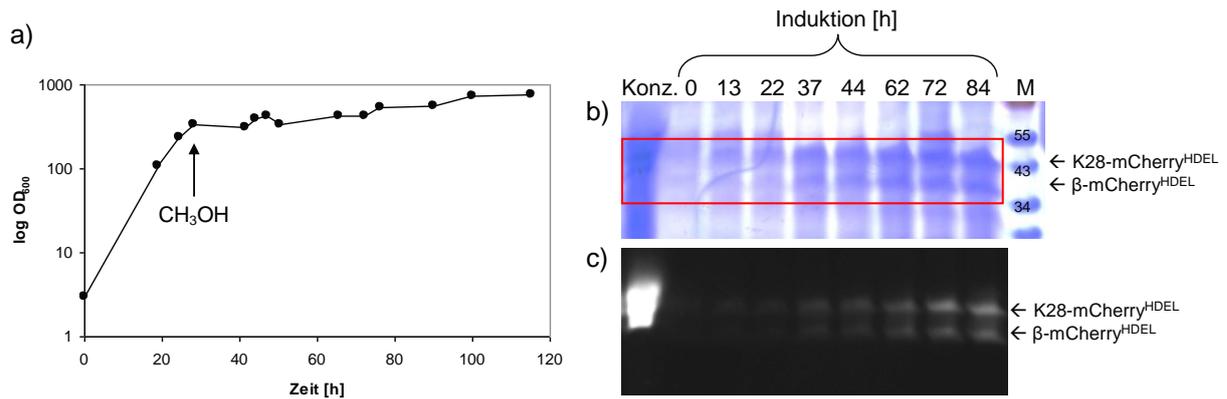


Abb. 23: Fermentationsverlauf von *P. pastoris* GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}]. **a)** Wachstumskurve. Der Logarithmus der optischen Dichte (OD₆₀₀) ist im Verlauf der Fermentation dargestellt. Der Zeitpunkt der Induktion durch Methanol-Zugabe (CH₃OH) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **b)** und **c)** Der zellfreie Kulturüberstand wurde im SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt (b) oder die Fluoreszenz unter UV-Licht detektiert (c). Der Größenbereich der Fusionsproteine (K28-mCherry^{HDEL} (48,4 kDa) und β-mCherry^{HDEL} (37,7 kDa)) ist rot markiert. Aufgetragen wurden die nicht erhitzten Proben zu verschiedenen Zeitpunkten während der Induktion sowie der konzentrierte Kulturüberstand nach Beendigung der Fermentation (Konz.). (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas).

Während der Fermentation sollte der Sauerstoffeintrag möglichst niedrig gehalten werden, da K28 Sauerstoff-sensitiv ist. Daher wurde die Zugabe von Methanol, als einzige Kohlenstoffquelle ein wachstumsbegrenzender Faktor, möglichst gering gehalten, so dass der Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks ohne zusätzliche Sauerstoffzugabe eingehalten werden konnte. Zudem wurde so eine eventuelle negative Auswirkung einer hohen Methanolkonzentration auf die Aktivität von K28 reduziert. Ein typischer Fermentationsverlauf zur Herstellung von K28-Varianten in *P. pastoris* ist Abb. 24 zu entnehmen. Die Glycerin-Batch Phase war nach ca. 12 h beendet, zu erkennen am Abfall der Rührrate und dem steigenden Sauerstoffpartialdruck, ein Indiz für den vollständigen Verbrauch des im Fermentationsmedium vorhandenen Glycerins. Die Glycerin-Fed-Batch-Phase wurde nach ca. 45 h unterbrochen und sukzessive die Methanol-Fed-Batch-Phase eingeleitet, wobei die Methanolzugabe mit einem Wert von 1,7 ml/h so gering wie möglich gehalten wurde.

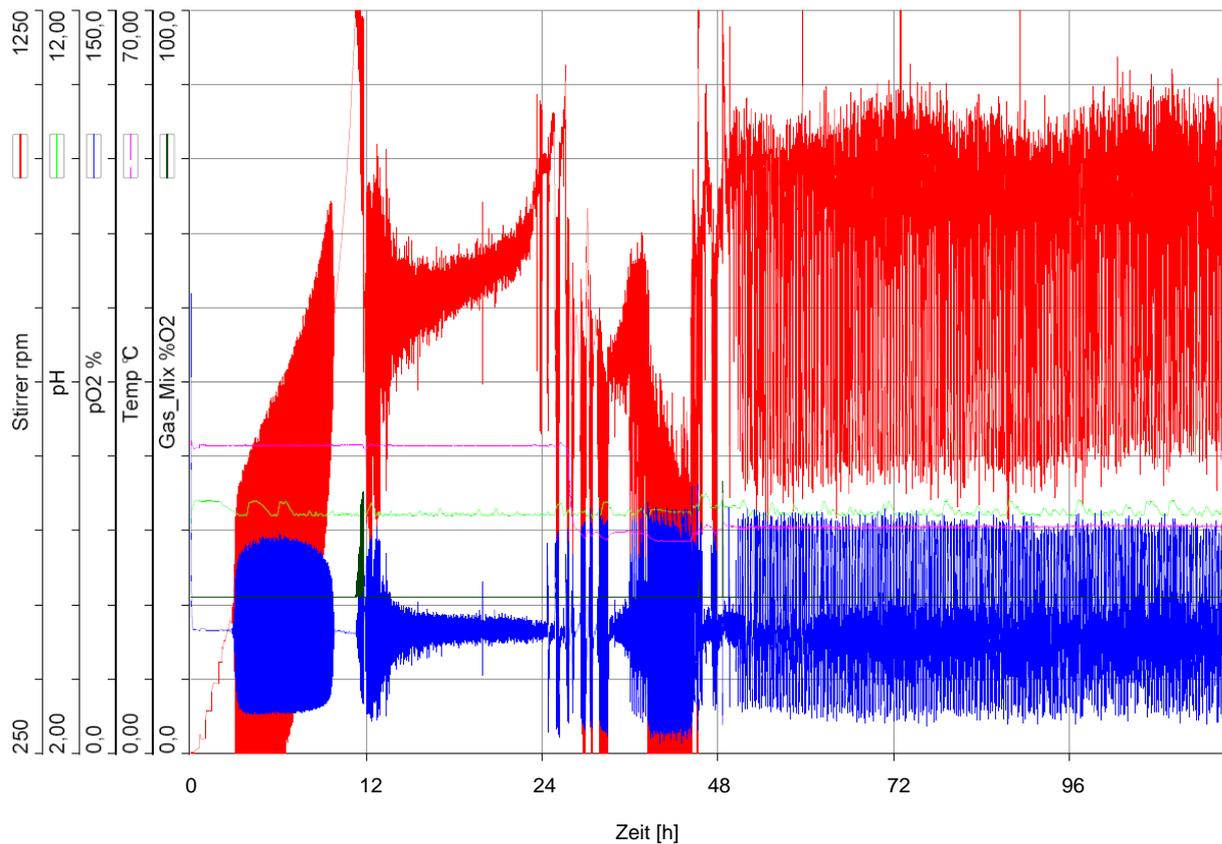


Abb. 24: Typischer Fermentationsverlauf von *P. pastoris* zur K28-Toxinproduktion. Dargestellt sind Rührrate (Stirrer), pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck (pO₂), Temperatur sowie Sauerstoffzugabe (Gas_Mix % O₂) im Zeitverlauf.

Die biologische Aktivität des sezernierten K28-mCherry^{HDEL} wurde im Agardiffusionstest gegen eine sensitive Hefe (192.2d) bestimmt. Die Hemmhofgröße betrug zum Zeitpunkt t_0 der Induktion 0 mm und stieg bis auf 8 mm (t_{Ende}) an. Der fünffach konzentrierte Fermenterüberstand erzeugte einen Hemmhof von 18 mm, vergleichbar mit wildtypischem K28-Konzentrat (200fach) (Abb. 25). Somit konnte durch die Kultivierung von *P. pastoris* im Fermenter erstmals eine fluoreszierende K28-Chimäre exprimiert werden, deren Killeraktivität auch während der Fermentation erhalten blieb.

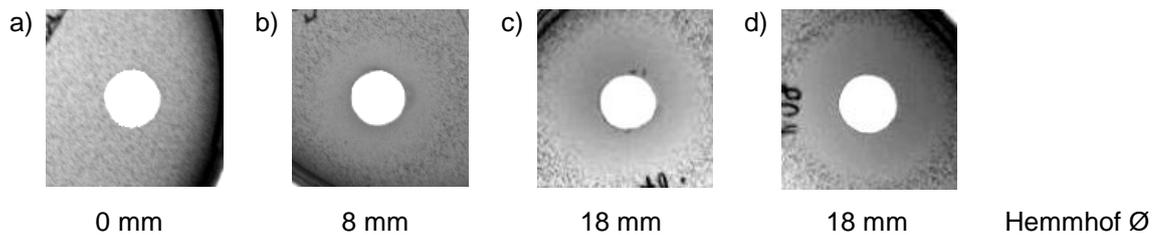


Abb. 25: Agardiffusionstest des Fermenterüberstandes einer Kultur von *P. pastoris* GS115 [pPIC9 K28-mCherry^{HDEL}]-Fermenterüberstandes. Die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d wurde in SC-Glucose-MBA eingebettet, die zu testende Toxinlösung zugegeben und 3 d bei 20 °C inkubiert. Hemmhofangaben entsprechen dem Durchmesser abzüglich des ausgestanzten Lochs.

- Zeitpunkt t_0 der Induktion
- Zeitpunkt t_{Ende} der Fermentation
- fünffach konzentrierter Fermenterüberstand
- Wildtypisches K28-Konzentrat (200fach) aus *S. cerevisiae* MS300b

3.1.3. Reinigung fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten

Zunächst wurde zur Umpufferung des Toxinkonzentrates eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, wobei K28-mCherry^{HDEL} in Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,3 bzw. 4,8 aufgenommen wurde (Abb. 26). Das erhaltene Toxinkonzentrat zeigte weiterhin Killeraktivität gegen den hypersensitiven Stamm 192.2d (Hemmhof: 17 mm). Auch gegen den sensitiven Stamm *S. cerevisiae* S86c zeigte das Toxinpräparat einen Hemmhof von 8 mm. Die Gesamtproteinkonzentration der Toxinlösung betrug 5,9 mg/ml.

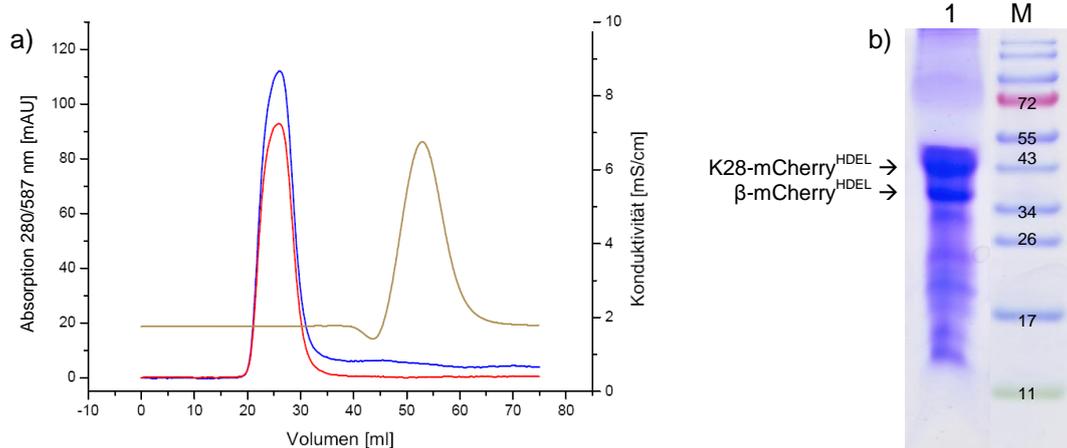


Abb. 26: Ergebnis der Umpufferung von K28-mCherry^{HDEL} in 10 mM Citrat-Puffer pH 5,3. a) Verlauf der Gelfiltration (Sephadex G-25). Absorption 280 nm (blau), Absorption 587 nm (rot), Konduktivität (beige). Das Eluat (1, siehe Absorptionspeak a) wurde im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (b). Die Proteinkonzentration der Lösung betrug 5,9 mg/ml.

(M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas).

In einem nächsten Schritt sollte das K28-mCherry^{HDEL} Toxinkonzentrat (vgl. Abb. 26 b) gereinigt werden. Der isoelektrische Punkt des Fusionsproteins liegt bei 4,8. Bei einem pH-Wert vor 5,3 ist das Toxin somit negativ geladen, daher sollte eine Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie möglich sein. Das Toxinkonzentrat wurde durch Gelfiltrationschromatographie in 20 mM Piperazin pH 5,4 überführt und auf eine Hi Trap Q HP Säule aufgetragen (Probenvolumen: 15 ml). Die Elution erfolgte durch Anlegen eines linearen Salzgradienten. Der Verlauf der Chromatographie sowie das Coomassie-Gel des Eluats sind in Abb. 27 dargestellt. Im Eluat konnte nach Coomassie-Färbung nur noch eine einzelne Bande von ca. 48 kDa detektiert werden, welche K28-mCherry^{HDEL} entspricht (Proteinkonzentration 430 µg/ml). Die Fluoreszenz des Fusionsproteins blieb erhalten (Abb. 27 c), jedoch zeigte das Toxinkonzentrat keine Killeraktivität. Diese konnte auch nach erneutem Umpuffern in Citrat-Puffer pH 5,3 nicht wiederhergestellt werden. Die Verwendung von Bis-Tris Puffer pH 5,6 zur Anionenaustauschchromatographie resultierte ebenfalls in einem Verlust der Killeraktivität.

Da eine Anionenaustauschchromatographie mit 10 mM Citrat Puffer pH 5,3 nicht zur Reinigung des Fusionsproteins führte, wurden im Folgenden die hergestellten Toxinkonzentrate direkt nach Umpufferung durch Gelfiltrationschromatographie (10 % McIlvaine Puffer pH 4,8 bis 5,3) zu weiteren Experimenten eingesetzt. Zudem sekretiert *P. pastoris* nur geringe Mengen endogenes Protein und wächst in einer Protein-freien Mineral-Salz-Lösung (Tolner *et al.*, 2006), so dass auf eine weitere Reinigung verzichtet werden konnte. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die umpufferten Toxinkonzentrate bei -20 °C aufbewahrt. Nach Lyophilisation konnte das Toxin ohne Aktivitätsverlust bei 4 °C gelagert werden.

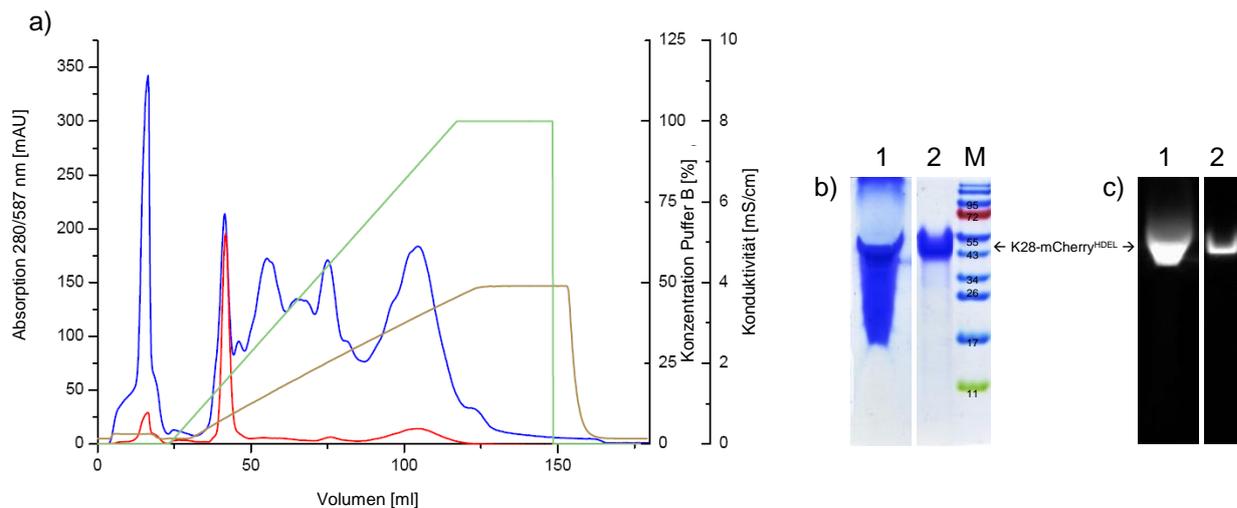


Abb. 27: Ergebnis der Anionenaustauschchromatographie von K28-mCherry^{HDEL} in 20 mM Piperazin pH 5,4. **a)** Verlauf der Chromatographie. Absorption 280 nm (blau), Absorption 587 nm (rot), Konzentration Puffer B (20 mM Piperazin, 0,5 M NaCl, pH 5,4) (grün), Konduktivität (beige). **b)** und **c)** Das Eluat (1), siehe Absorptionspeak 587 nm (a), wurde im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (b) oder die Fluoreszenz unter UV-Licht detektiert (c).

- (1) nicht gereinigtes K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat
- (2) Eluat der Anionenaustauschchromatographie (Absorptionspeak 587 nm, Proteinkonzentration 430 µg/ml)
- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas).

3.1.4. Herstellung weiterer fluoreszenzmarkierter K28-Toxinvarianten

Nachdem die optimalen Bedingungen zur Expression von fluoreszierenden und biologisch aktiven K28-Toxinvarianten bestimmt werden konnten, wurden zum „live cell imaging“ als Kontrollen folgende Toxinvarianten hergestellt: α/β -Toxin fusioniert an ein Fluoreszenzprotein ohne C-terminales HDEL-Signal und das Fluoreszenzprotein mit bzw. ohne C-terminalem HDEL-Signal. Abb. 28 gibt einen Überblick über den Aufbau der Konstrukte. Sie wurden mittels PCR bzw. SOE-PCR hergestellt und durch *Xho*I/*Not*I-Restriktion in den Vektor pPIC9 eingefügt, so dass die Sekretion durch das Signal des α -Mating-Faktors gewährleistet wurde. Die Transformation in *P. pastoris*, die Kultivierung im Fermenter und die Umpufferung der Toxinkonzentrate erfolgte wie zuvor für die Herstellung von K28-mCherry^{HDEL} beschrieben. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Fermentationen der Toxinchimären und Kontrollen sowie zum Vergleich von wildtypischem K28 dargestellt.

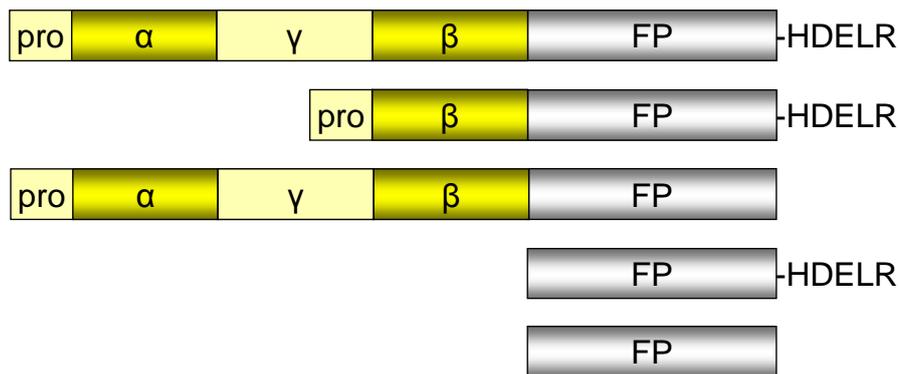


Abb. 28: Schematische Darstellung der konstruierten fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten und der Kontrollen. Die Toxinvarianten enthalten das K28-Protoxin oder die Pro-Region, verbunden mit der K28- β -Untereinheit, C-terminal gefolgt von einem Fluoreszenzprotein (FP: mCherry, yEGFP oder mTFP). Zur Kontrolle wurden Fluoreszenzproteine mit bzw. ohne C-terminalem HDEL-Signal hergestellt. Die Konstrukte enthalten im 5'-Bereich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Xho*I sowie eine *Kex2p*-Schnittstelle. Im 3'-Bereich wurden Schnittstellen für *Not*I, *Sal*I und *Bgl*II angefügt.

Das Ergebnis der Fermentation von *P. pastoris* GS115 [K28-mCherry^Δ] sowie zum Vergleich von GS115 [pPIC3.5 K28wt] ist Abb. 29 zu entnehmen. GS115 [pPIC3.5 K28wt] wurde bereits erfolgreich zur Expression von biologisch aktivem wildtypischen K28 eingesetzt (Eiden-Plach *et al.*, 2004). Erstmals konnte in dieser Arbeit wildtypisches aktives K28 durch Fermentation gewonnen werden. Das Toxin lag sowohl als Monomer (21,7 kDa) als auch als Dimer (43,4 kDa) vor. Die fluoreszierende Toxinchimäre ohne C-terminales HDEL-Signal, K28-mCherry^Δ, wurde ebenfalls sezerniert, wobei durch Spaltung der Disulfidbrücke auch β -mCherry^Δ entstand. Wie erwartet zeigte diese Variante aufgrund des fehlenden HDEL-Signals keine *in vivo* Killeraktivität.

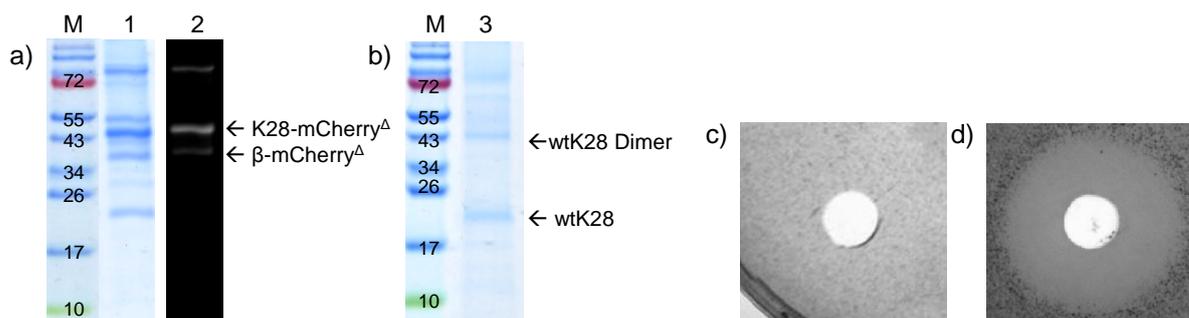


Abb. 29: K28-Analyse nach Fermentation von *P. pastoris* GS115 [pPIC9 K28-mCherry^Δ] und GS115 [pPIC3.5 K28wt]. Nachweis von K28-mCherry^Δ und K28wt im Kulturüberstand sowie deren biologische Aktivität. **a)** Coomassie-Färbung. Der zellfreie Kulturüberstand wurde nach Beendigung der Fermentation im SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt.

- (1) GS115 [pPIC9 K28-mCherry^Δ],
- (2) GS115 [pPIC9 K28-mCherry^Δ], detektiert unter UV-Licht
- (3) GS115 [pPIC3.5 K28wt],
- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas).

c) und **d)** Agardiffusionstest. Die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d wurde in SC-Glucose-MBA eingebettet, der zellfreie Kulturüberstand von **c)** GS115 [pPIC9 K28-mCherry^Δ] oder **d)** GS115 [pPIC3.5 K28wt] nach Beendigung der Fermentation zugegeben und 3 d bei 20 °C inkubiert. Der Hemmhofdurchmesser, abzüglich des ausgestanzten Lochs, betrug 19 mm (d).

Des Weiteren konnten sowohl mCherry^{HDEL} als auch mCherry^Δ durch Fermentation von *P. pastoris* produziert werden, wobei eine Fluoreszenz erst nach Konzentration der Kulturüberstände beobachtet werden konnte (Abb. 30): Das Bandenmuster entspricht nicht dem erwarteten Molekulargewicht von mCherry (26,7 kDa). Wurden die Proben nicht erhitzt, ergaben sich fluoreszierende hochmolekulare Banden im Bereich von 60 bis 70 kDa, wahrscheinlich bedingt durch eine Dimerbildung. Nach dem Aufkochen der Proben waren Banden bei ca. 30 und 20 kDa zu erkennen. Dieses Phänomen wurde bereits für das tetramere DsRed beschrieben und ist auf eine Hydrolyse der in GFP nicht vorhandenen (C=N)-Bindung im Acylimin-Substituenten zurückzuführen (Gross *et al.*, 2000).

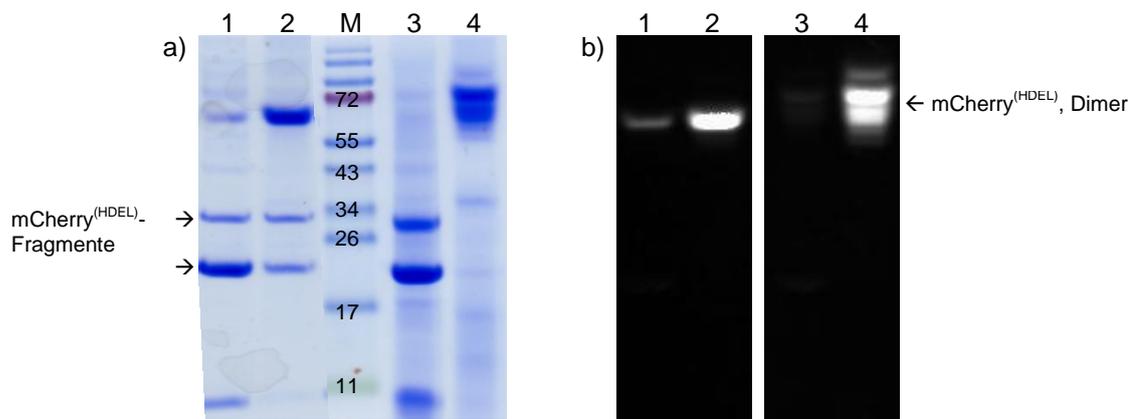


Abb. 30: Analyse von mCherry-Varianten nach Fermentation von *P. pastoris* GS115 [pPIC9 mCherry^{HDEL}] und GS115 [pPIC9 mCherry^Δ]. Coomassie-Färbung (a) und UV-Detektion (b) der durch SDS-PAGE aufgetrennten, konzentrierten und in McIlvaine-Puffer pH 5,3 überführten Kulturüberstände.

- (1) GS115 [pPIC9 mCherry^Δ], erhitzt auf 100 °C
- (2) GS115 [pPIC9 mCherry^Δ]
- (3) GS115 [pPIC9 mCherry^{HDEL}], erhitzt auf 100 °C
- (4) GS115 [pPIC9 mCherry^{HDEL}]

Zusätzlich zu GFP und mCherry wurde mTFP, eine monomere Version von CFP aus der Koralle *Clavularia*, ein sehr helles und photostabiles Fluoreszenzprotein, mit K28 fusioniert (Ai *et al.*, 2006). mTFP wurde bereits in der Hefe *S. cerevisiae* erfolgreich als Fusionsprotein zur konfokalen Mikroskopie genutzt (Deng *et al.*, 2009).

K28-mTFP^{HDEL} konnte in *P. pastoris* exprimiert werden (Abb. 31 a). Die Coomassie-Färbung des im SDS-Gel aufgetrennten Fermenterüberstands zeigte sowohl K28-mTFP^{HDEL} (48,6 kDa) als auch β -mTFP^{HDEL} (37,9 kDa, durch Spaltung der Disulfidbrücke). Unter reduzierenden Bedingungen konnte nur noch β -mTFP^{HDEL} nachgewiesen werden, was auf eine korrekte Prozessierung des Fusionsproteins schließen lässt. Die Fluoreszenz war deutlich schwächer als bei K28-mCherry^{HDEL} ausgeprägt und nur nach Konzentration der Proben detektierbar. Die biologische Aktivität des Toxinkonzentrates wurde im Agardiffusionstest bestätigt (Abb. 31 c).

Die Kontrolle mTFP^{HDEL} wurde analog zu K28-mTFP^{HDEL} in *P. pastoris* exprimiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Kulturüberstandes zeigte die Coomassie-Färbung eine starke Bande von ca. 38 kDa. Das Molekulargewicht von mTFP beträgt 27 kDa. Die Abweichung könnte durch ein verändertes Laufverhalten bedingt sein. Ein ähnliches Phänomen wurde bei mCherry beobachtet (siehe oben). Wie erwartet besaß mTFP^{HDEL} keine Killeraktivität (Abb. 31 d)

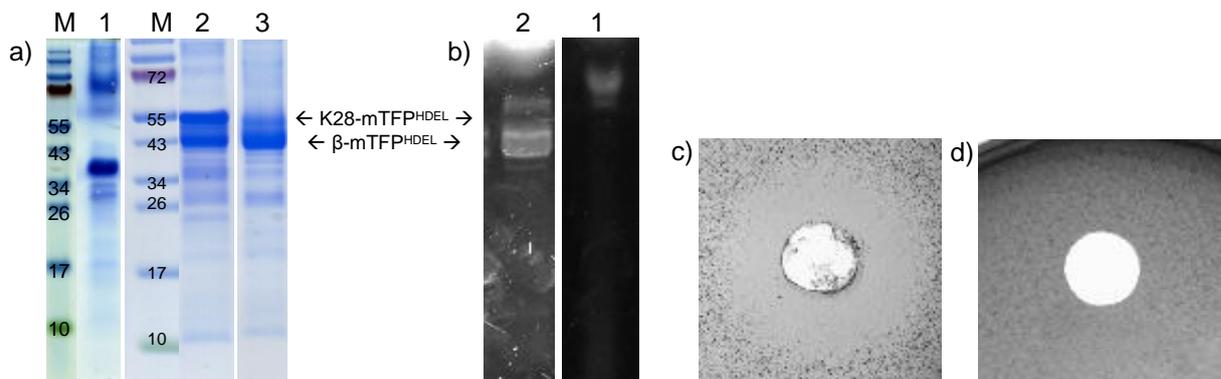


Abb. 31: K28/mTFP-Analyse nach Fermentation von *P. pastoris* GS115 [pPIC9 K28-mTFP^{HDEL}] und GS115 [pPIC9 mTFP^{HDEL}]. Nachweis von mTFP^{HDEL} und K28-mTFP^{HDEL} im Kulturüberstand sowie deren biologische Aktivität. **a)** Coomassie-Färbung. Der zellfreie Kulturüberstand wurde nach Beendigung der Fermentation im SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. **b)** UV-Detektion. Der Fermenterüberstand wurde konzentriert (sechsfach), im SDS-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

- (1) GS115 [pPIC9 mTFP^{HDEL}]
- (2) GS115 [pPIC9 K28-mTFP^{HDEL}] nicht reduzierend,
- (3) GS115 [pPIC9 K28-mTFP^{HDEL}] reduzierend,
- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas).

c) und **d)** Agardiffusionstest. Die sensitive Hefe *S. cerevisiae* 192.2d wurde in SC-Glucose-MBA eingebettet, der zellfreie Kulturüberstand von c) GS115 [pPIC9 K28-mTFP^{HDEL}] oder d) GS115 [pPIC9 mTFP^{HDEL}] nach Beendigung der Fermentation zugegeben und 3 d bei 20 °C inkubiert. Der Hemmhofdurchmesser, abzüglich des ausgestanzten Lochs, betrug 14 mm (c).

Tab. 16 fasst die durch Fermentation hergestellten Toxinvarianten und Kontrollen zusammen. Killeraktivität konnte nur bei K28-Fusionen festgestellt werden, welche als K28-Heterodimer vorlagen und ein C-terminales HDEL-Signal aufwiesen. Die Toxizität der K28-Varianten schwankte jedoch sehr stark zwischen einzelnen Fermentationen, auch bei Kultivierung des gleichen Toxin-exprimierenden *P. pastoris*-Stamms, so dass die Daten nicht zu einem quantitativen Vergleich der Killeraktivität der K28-Chimären herangezogen werden konnten. Anhand der K28-Proteinmenge im Kulturüberstand, welche aus der Bandenstärke im Coomassie-Gel abzulesen ist, kann jedoch auf eine verminderte Killeraktivität der K28-Fusionen im Vergleich zum deutlich schwächer sezernierten wildtypischen K28 geschlossen werden.

Die Fluoreszenz war bei den α/β-mCherry-Fusionen am stärksten und konnte direkt nach Auftrennung des Kulturüberstandes im SDS-Gel unter UV-Licht detektiert werden. β-mCherry^{HDEL} konnte nicht im Fermenterüberstand nachgewiesen werden. Die

Fluoreszenzmikroskopie von GS115 [pPIC9 β -mCherry^{HDEL}] unter induzierenden Bedingungen zeigte eine starke rote Fluoreszenz im Bereich der Vakuole, was auf einen Abbau des Fusionsproteins hindeutet. Während der Fermentation der α/β -Varianten wurde durch Spaltung der Disulfidbrücke auch nur die β -Untereinheit, fusioniert an ein Fluoreszenzprotein, gebildet. Daher wurde von einer Optimierung der β -mCherry^{HDEL} Expression abgesehen.

Tab. 16: Zusammenfassung der Fermentationsergebnisse zur Herstellung fluoreszierender K28-Varianten: Fluoreszenz und Killeraktivität der K28-Toxinvarianten und Kontrollen. Die aufgeführten Varianten wurden nach Fermentation von *P. pastoris* GS115 durch Konzentration der jeweiligen Kulturüberstände erhalten. Die Killeraktivität wurde im Agardiffusionstest gegen *S. cerevisiae* 192.2d bestimmt.

Toxinvariante/Kontrolle	Fluoreszenz	Killeraktivität
K28-GFP ^{HDEL}	+	+
K28-mCherry ^{HDEL}	+++	+
K28-mCherry ^Δ	+++	-
K28-mTFP ^{HDEL}	++	+
K28wt	-	++
mCherry ^{HDEL}	+	-
mCherry ^Δ	+	-
mTFP ^{HDEL}	+	-

Auffallend war die Entstehung von Proteinaggregaten, welche sowohl bei der Zentrifugation der Toxinkonzentrate als auch bei der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte. Um die Aggregatbildung zu verhindern, wurden unter anderem Salze oder Detergentien wie Triton X-100, CHAPS, Natrium-Desoxycholat, n-Octyl- β -D-glucopyranosid sowie Arginin oder Betain in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (Zhang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1985a und 1985b; Nguyen, 2007; Natalello *et al.*, 2008). Dies führte zum Teil zu einem Verlust der Fluoreszenz der Toxinlösung bzw. konnte die Aggregatbildung nicht verhindern.

3.2. Untersuchungen zur Aufnahme fluoreszenzmarkierter K28-Varianten

Die Aufnahme und der intrazelluläre Transport sind essentielle Komponenten, welche die Wirkung von Toxinen beeinflussen. Das Verständnis der Toxinwirkung kann durch die Visualisierung des Toxin-Traffickings vertieft werden. Zudem stellen fluoreszenzmarkierte Toxine hilfreiche Modell-Cargos zur Aufklärung essentieller zellbiologischer Prozesse wie der Endozytose dar. Bereits mehrere Toxine und Pathogene wurden, mit einem Fluorophor gekoppelt, zum „live cell imaging“ eingesetzt, darunter Cholera-Toxin, Anthrax-Toxin, Ricin sowie das Dengue Virus (Tinker *et al.*, 2005; Zornetta *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006; van der Schaar *et al.*, 2008). Da sich die bisherigen Untersuchungen zur Aufnahme und zum retrograden Transport von K28 auf Zellfraktionierungsstudien und Bestimmung der Toxinsensitivität von Deletionsmutanten beschränkten, sollte der Einsatz fluoreszenzmarkierter K28-Varianten zur Aufklärung dieser Prozesse, auch im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf, beitragen. In Säugerzellen konnte bislang die Aufnahme von wildtypischem K28 nur durch Zellaufschluss und Western-Blot Analysen gezeigt werden (Klein, 2009). Daher sollten im Folgenden die Endozytose und der intrazelluläre Transport von fluoreszenzmarkierten K28-Toxinvarianten durch Hefe- und Säugerzellen an lebenden Zellen mikroskopisch untersucht werden.

3.2.1. Subzelluläre Fraktionierung sensitiver Hefezellen zur Untersuchung der K28-mCherry^{HDEL} Aufnahme

Die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten K28-Chimären durch sensitive Hefen konnte durch den Nachweis ihrer Killeraktivität im Agardiffusionstest bereits bestätigt werden: Um die Hefezellen abzutöten, muss das Toxin aufgenommen und intrazellulär bis in das Zytosol transportiert werden, so dass die α -Untereinheit in den Kern gelangen und dort ihre toxische Wirkung entfalten kann. Zusätzlich sollte die Toxinaufnahme durch Zellfraktionierungsstudien bestätigt werden. Diese Methode wurde von Einfeld *et al.* (2000) zur Untersuchung der K28-Aufnahme und des intrazellulären Transports in Hefen etabliert. In wildtypischen Zellen konnte K28 in der Zellwandfraktion (P1), der intrazellulären Membranfraktion (P13), der endosomalen Vesikelfraktion (P100) und im Zytosol (S100) detektiert werden.

Zur Untersuchung der Aufnahme von Toxinchimären wurde K28-mCherry^{HDEL} gewählt, da diese Variante durch ihre starke Fluoreszenz gut nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden sensitive Hefezellen sphäroplastiert und mit osmotisch stabilisiertem K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat inkubiert. Nach einem milden Zellaufschluss wurden die Kompartimente durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt. Der Toxinnachweis

erfolgte nach Auftrennung der einzelnen Fraktionen im SDS-Gel durch Detektion der fluoreszierenden Toxin-Chimären unter UV-Licht. Das Ergebnis der Zellfraktionierung von SEY6210 nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} ist in Abb. 32 dargestellt. K28-mCherry^{HDEL} konnte in allen Fraktionen, einschließlich des Zytosols nachgewiesen werden, wobei in den Vesikel- und zytosolischen Fraktionen hauptsächlich β -mCherry^{HDEL} akkumulierte. Diese Beobachtung ist auch für wildtypisches K28 beschrieben. Nach zweistündiger Toxininkubation lag nur noch die dissoziierte Form im Zytosol vor (Heiligenstein *et al.*, 2006). Die Detektion von Markerproteinen zur Bestätigung der Reinheit der einzelnen Fraktionen ist in Punkt 3.4.3.2. aufgeführt.

Durch Zellfraktionierung Toxin-behandelter Hefezellen konnte somit erstmals die Aufnahme einer chimären K28-mCherry^{HDEL}-Fusion gezeigt werden. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen an wildtypischem K28 konnte auch für die K28/mCherry-Fusion ein retrograder Transport bis in das Zytosol bestätigt werden. Dort konnten geringe Mengen des Heterodimers, hauptsächlich aber β -mCherry^{HDEL} nachgewiesen werden. Das Erreichen des Zytosols ist eine Voraussetzung für die toxische Wirkung von K28, da die α -Untereinheit von dort durch passive Diffusion den Kern erreichen kann, wo der Zellzyklus-Arrest ausgelöst wird.

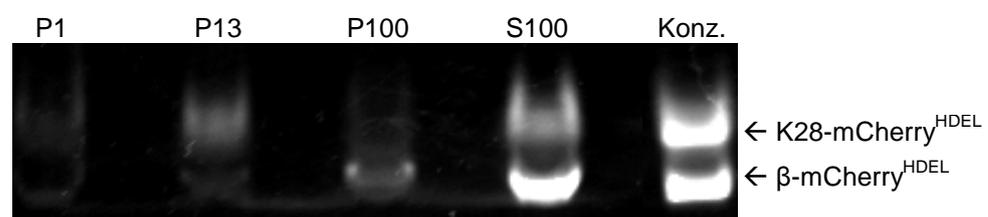


Abb. 32: UV-Detektion subzellulärer Fraktionen nach K28-mCherry^{HDEL}-Inkubation. *S. cerevisiae* SEY6210 wurde nach Sphäroplastierung mit osmotisch stabilisiertem K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat 2 h inkubiert, nach zweimaligem Waschen im Homogenisator aufgeschlossen und das Zellysate durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Die Fraktionen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und die Fluoreszenz des Fusionstoxins unter UV-Licht detektiert.

- P1 Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen
- P13 ER-Membranen, Plasmamembran, vakuoläre Membranen, Mitochondrien
- P100 Endosomen, Vesikel
- S100 zytosolische Fraktion
- Konz. K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat

3.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Hefezellen nach Behandlung mit fluoreszierenden K28-Chimären

Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten K28-Varianten erlaubt die Visualisierung der K28-Endozytose und des intrazellulären Transportes in Hefezellen. Ein Vorteil gegenüber der Immunfluoreszenz und der Elektronenmikroskopie ist die Möglichkeit, lebende Zellen zu untersuchen und die Toxinaufnahme in Echtzeit zu verfolgen. So konnte auch die Endozytose von Alexa Fluor-markiertem α -Faktor fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden (Toshima *et al.*, 2006). Diese Experimente haben entscheidend dazu beigetragen, die zeitliche Abfolge der endozytotischen Prozesse genauer zu charakterisieren und beteiligte Proteine zu identifizieren, da in der Hefe auch entsprechende Deletionsmutanten zum „live cell imaging“ zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zu einem fluoreszenzmarkierten Rezeptor, welcher sowohl in endozytotischen als auch biosynthetischen Kompartimenten lokalisiert ist, werden durch den Liganden, den Alexa-Fluor-getaggten α -Faktor, selektiv die endozytotischen Kompartimente detektiert. Ebenso sollte die Visualisierung der K28-Aufnahme Aufschluss über die Endozytose und den intrazellulären Toxintransport geben.

3.2.2.1. Inkubation von Hefezellen mit K28-mCherry^{HDEL}

Zunächst wurde K28-mCherry^{HDEL} zu „live cell imaging“ Experimenten ausgewählt. Diese Toxinvariante zeigte neben der biologischen Aktivität eine sehr starke Fluoreszenz, was die Fluoreszenzmikroskopie von K28-mCherry^{HDEL} behandelten Hefezellen begünstigen sollte. Sensitive Hefen wurden dazu mit K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat in Inkubationspuffer 2 h bei 20 °C unter leichtem Schütteln (60 rpm) inkubiert. Nach dieser Zeit sollte das Toxin endozytiert und retrograd bis auf die Stufe des Zytosols transportiert worden sein (Heiligenstein *et al.*, 2006). Die Inkubationstemperatur von 20 °C entspricht dem Temperaturoptimum von K28. Überschüssiges Toxinkonzentrat wurde durch zweimaliges Waschen entfernt, um die Hintergrundfluoreszenz zu verringern. Wie aus Abb. 33 ersichtlich wird, zeigten die Zellen eine sehr starke Fluoreszenz im Randbereich. Die konfokale Laserscanning Mikroskopie mit einer deutlich verbesserten Auflösung ergab ebenfalls ein klar abgegrenztes peripheres Signal.

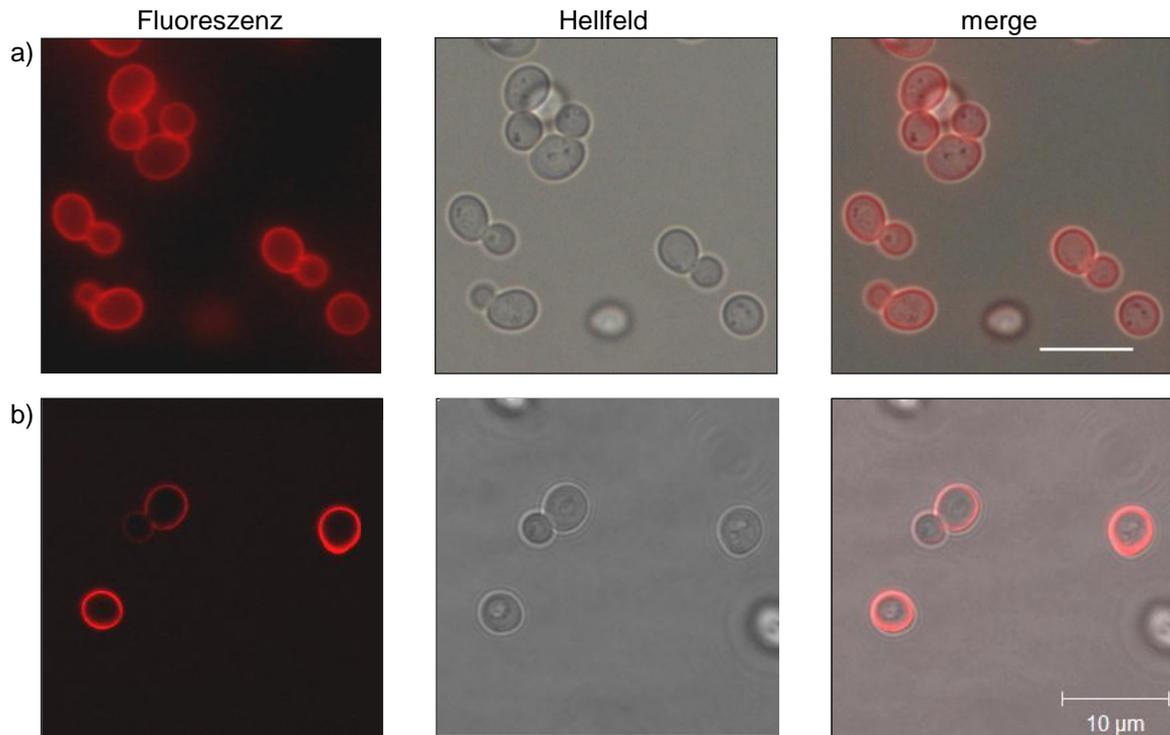


Abb. 33: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. *S. cerevisiae* BY4742 wurde nach 2 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat in Inkubationspuffer bei 20 °C, 60 rpm und zweimaligem Waschen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 µm. Mikroskop: **a)** Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtung: 1/80 s. **b)** cLSM 510 Meta (Zeiss), average: 4, pinhole: 204 µm, Laser 543 nm: 9,1 %.

Die Aufnahmen wurden mit einem „Structured Illumination“ Mikroskop wiederholt. Diese Mikroskopie-Technik erreicht eine Auflösung von 100 nm, was der zweifachen Auflösung eines herkömmlichen Fluoreszenzmikroskops entspricht. Wie Abb. 34 zu entnehmen ist, ergab sich ein identisches Bild: Die Zellen zeigten eine starke Fluoreszenz im Randbereich, intrazelluläre Signale waren nicht zu detektieren. Auch die hypersensitive Hefe 192.2d zeigte keine intrazelluläre Fluoreszenz. Parallel wurde eine Färbung der Plasmamembran durchgeführt: Der amphipatische Farbstoff „Cell mask deep red“ (Invitrogen) besteht aus einer lipophilen Untereinheit, welche den negativ geladenen hydrophilen Farbstoff in der Membran verankert. Die Fluoreszenz von K28-mCherry^{HDEL} scheint mit der Plasmamembranfärbung zu überlappen. „Cell mask deep red“ wurde bisher nicht zur Anwendung an Hefezellen beschrieben, daher ist nicht bekannt, ob die Plasmamembran spezifisch gefärbt wird, oder ob der Farbstoff noch an andere Zellbestandteile wie z. B. die Zellwand bindet.

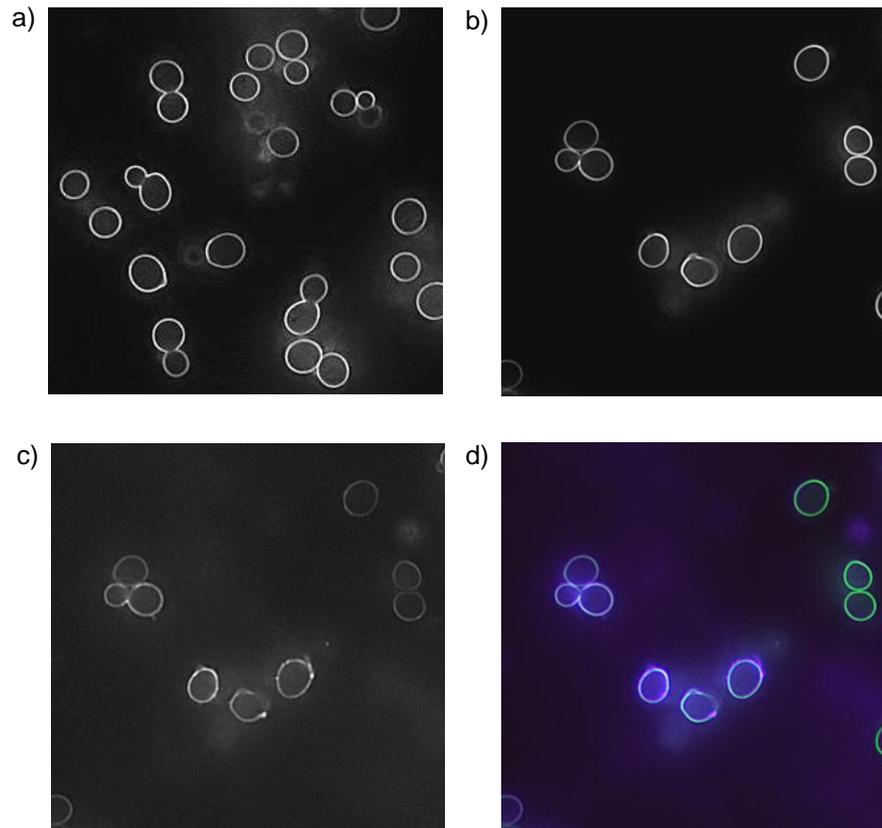


Abb. 34: „Structured Illumination“ Mikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. *S. cerevisiae* BY4742 bzw. 192.2d wurde nach 2 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat in Inkubationspuffer bei 20 °C, 60 rpm und nach zweimaligem Waschen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. 63fache Vergrößerung. Zeiss-Mikroskop (Prototyp), Laser 561 nm: 0,5 %, Laser 635 nm: 2 %.

- a) 192.2d + K28-mCherry^{HDEL}
- b) BY4742 + K28-mCherry^{HDEL}
- c) b), inkubiert mit dem Plasmamembranfarbstoff „Cell mask deep red“ (Invitrogen)
- d) Überlagerung von b), grün und c), violett.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der fluoreszenzmarkierte K28-Rezeptor, Erd2-GFP, mit K28-mCherry^{HDEL} kolokalisiert. Der HDEL-Rezeptor Erd2p ist hauptsächlich in Golgi und ER lokalisiert, in geringer Anzahl kommt Erd2p auch in der Plasmamembran vor (Dausend, 2010). K28 nutzt Erd2p als Sekundärrezeptor, um durch Endozytose und retrograden Transport sein Zielkompartiment zu erreichen. Wie in Abb. 35 dargestellt, konnte keine eindeutige Kolokalisation zwischen K28-mCherry^{HDEL} und Erd2-GFP beobachtet werden. Zusammenfassend ergab die Inkubation von *S. cerevisiae* mit K28-mCherry^{HDEL} eine starke Fluoreszenz in der Zellperipherie, die auch durch Anwendung hochauflösender Mikroskopie-Techniken bestätigt wurde.

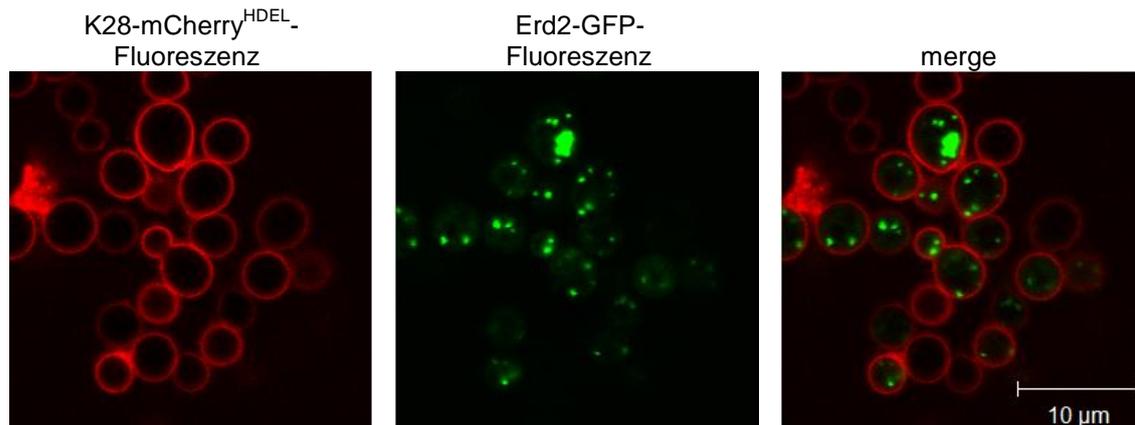


Abb. 35: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. *S. cerevisiae* BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] wurde in ura d/o Galaktose-Medium kultiviert. Zur Mikroskopie wurden die Zellen 2 h mit K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat inkubiert. 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 μ m. Mikroskop: cLSM 510 Meta (Zeiss), average: 4, pinhole (543 nm): 204 μ m, pinhole (488 nm): 256 μ m, Laser 543 nm: 9,1 %, Laser 488 nm: 10,1 %

3.2.2.2. Untersuchungen zur Zellwandbindung von fluoreszenzmarkiertem K28

Bei der ringförmigen Fluoreszenz im Zellrandbereich, welche nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} zu beobachten war, könnte es sich um Zellwandstrukturen handeln. Die Färbung der Zellwand mit Calcofluor White, welches irreversibel an Chitin bindet, ergab ein vergleichbares Muster (Abb. 36 a). Aufgrund des hohen Hintergrundes der Calcofluor White-Färbung konnte keine Analyse der Kolo-kalisation durchgeführt werden. Der K28-Primärrezeptor auf Ebene der Zellwand wurde als α -1,3-Mannoprotein identifiziert. Eine Δ *mnn2*-Deletionsmutante, welche aufgrund eines Defekts der α -1,2-Mannosyltransferase-I keine Seitenketten ausbilden kann, ist toxinresistent, da keine Toxinbindung mehr erfolgen kann (Schmitt & Radler, 1988). Nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} zeigte Δ *mnn2* nur sehr schwache punktuelle Fluoreszenzsignale im oberen bzw. unteren Zellrandbereich, eine ringförmige Fluoreszenz konnte nicht detektiert werden (Abb. 36 b). Die Bindung des Toxins an den zellulären Primärrezeptor kann durch Zugabe von Cetavlon-Mannoprotein (CMP) verhindert werden; mit steigender CMP-Konzentration nimmt die Killeraktivität ab (Schmitt & Radler, 1987). Diese Beobachtung konnte auch für K28-mCherry^{HDEL} bestätigt werden. Die Zugabe von 6 mg/ml CMP (Präparation siehe Weiler, 2002) konnte die Bindung von K28-mCherry^{HDEL} an die Hefezelle inhibieren (Abb. 36 c). Da die Mannoproteinpräparation aus Zellwänden des hypersensitiven Stammes 192.2d hergestellt wurde, wurde dieser Stamm auch zur Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} verwendet.

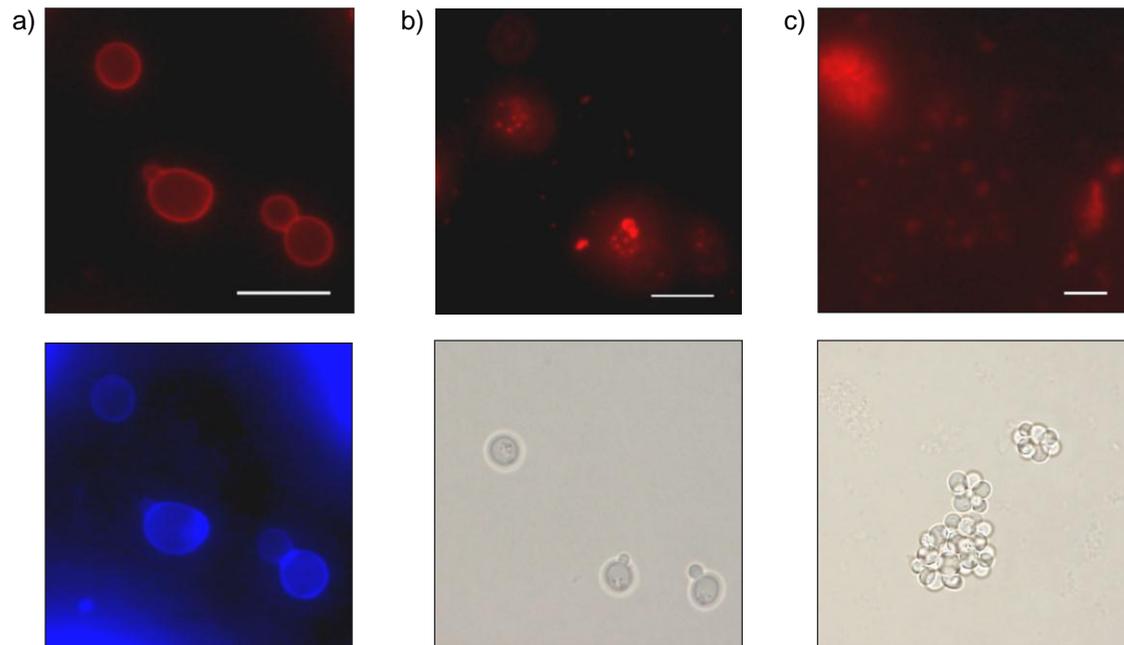


Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* (BY4742, $\Delta mnn2$, 192.2d) nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. Nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat in Inkubationspuffer (20 °C, 2 h, 60 rpm) und nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. a) und b) 100fache Vergrößerung, c) 50fache Vergrößerung. Messbalken: 10 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit wurde der jeweiligen Toxinkonzentration angepasst und ist in Klammern angegeben.

- a) BY4742 + K28-mCherry^{HDEL}, Calcofluor White-Färbung, mCherry-Fluoreszenz (1/35 s) und Calcofluor White-Fluoreszenz (1/23 s)
- b) $\Delta mnn2$ + K28-mCherry^{HDEL}, mCherry-Fluoreszenz (1/9 s) und Hellfeld
- c) 192.2d + K28-mCherry^{HDEL} + CMP (6 mg/ml), mCherry-Fluoreszenz (1/15 s) und Hellfeld

Die Ergebnisse (Abb. 36) deuten auf eine Bindung von K28-mCherry^{HDEL} an die Zellwand hin. Wurde diese durch Sphäroplastierung entfernt, ergab sich nach Inkubation mit osmotisch stabilisiertem K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat nur noch eine schwache punktuelle Fluoreszenz (Abb. 37 a). Die verbleibenden Signale sind vermutlich auf eine Bindung des Toxins an Zellwandreste zurückzuführen. Darüberhinaus wäre auch eine Bindung an den Sekundärrezeptor auf Plasmamembranebene möglich, da dieser vermutlich in Clustern vorliegt. Wurden Hefezellen erst nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} sphäroplastiert, führte dies zu einem vollständigen Verlust der Fluoreszenz (Abb. 37 b und c). Dieses Phänomen kann auch auf die Zusammensetzung des Sphäroplastierungspuffers zurückzuführen sein, wodurch die mCherry-Fluoreszenz stark reduziert wird.

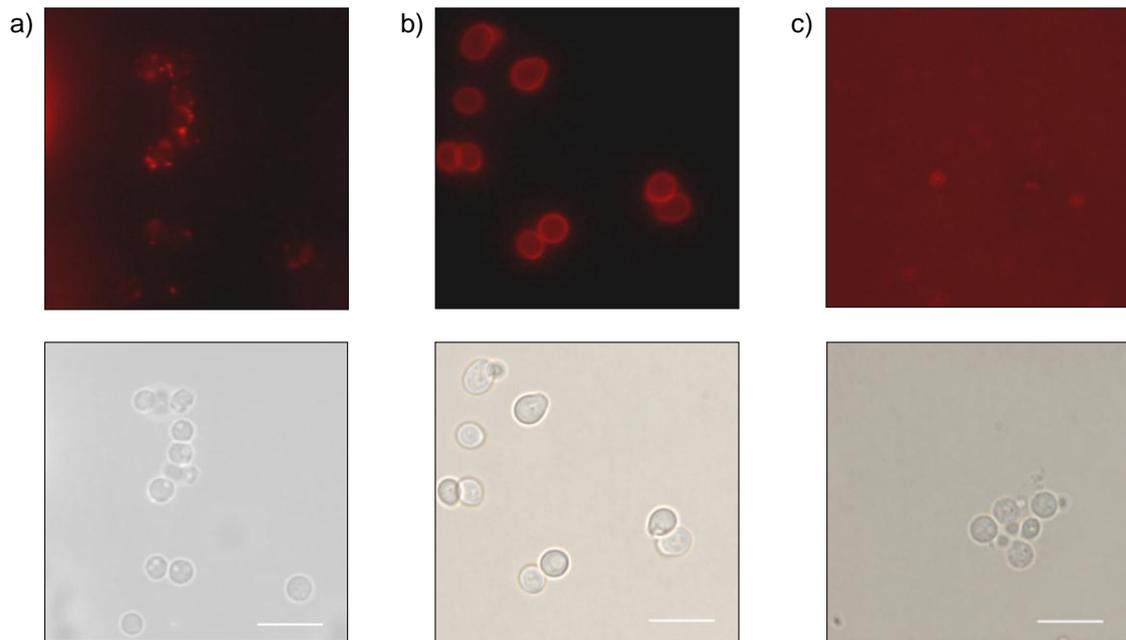


Abb. 37: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* (BY472) nach 2 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}: Einfluss der Sphäroplastierung. 100fache Vergrößerung. Messbalken: 10 μm . Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Dargestellt sind die mCherry-Fluoreszenz sowie die Hellfeld-Aufnahmen. Die Belichtungszeit ist in Klammern angegeben.

- Sphäroplasten nach Inkubation mit osmotisch stabilisiertem K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat (1/1.2 s)
- Intakte Zellen nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat (1/55 s)
- Anschließende Sphäroplastierung: Nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} (vgl. b) wurden die Zellen sphäroplastiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (1/3.5 s).

Die Vermutung, dass die beobachtete periphere Fluoreszenz von K28-mCherry^{HDEL} behandelten Hefezellen auf einer Bindung des Toxins an die Zellwand beruht, konnte durch die vorherigen Ergebnisse bekräftigt werden. Diese wird auch durch das Ergebnis der K28-mCherry^A-Inkubation unterstützt (Abb. 38): K28-mCherry^A lagerte sich an den Zellrandbereich an und führte zu einer einheitlichen ringförmigen Fluoreszenz, wobei kein Unterschied zu K28-mCherry^{HDEL} behandelten Hefezellen zu erkennen war. Zum Vergleich wurde die Gesamtproteinkonzentration der Toxinkonzentrate auf den gleichen Wert eingestellt und die Aufnahmen mit identischer Belichtungszeit durchgeführt. Auch Sphäroplasten zeigten nach Inkubation mit K28-mCherry^A nur noch punktuelle periphere Signale, was dem Ergebnis der HDEL-Variante entspricht (vgl. Abb. 37 a).

Da K28-mCherry^Δ kein C-terminales HDEL-Signal besitzt, sollte es nicht mehr in der Lage sein, mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran zu interagieren, was vermutlich aber Voraussetzung zur Endozytose und zum intrazellulären Transport ist. Wie bereits im Agardiffusionstest gezeigt (Abb. 29), besitzt diese Toxin-Chimäre keine Killeraktivität. Die durch K28-mCherry^Δ verursachte Fluoreszenz im Zellrandbereich könnte daher auf eine Bindung des Fusionstoxins an die Zellwand zurückzuführen sein. Die biologisch aktive Toxinvariante K28-mCherry^{HDEL} zeigte ein identisches Fluoreszenzmuster im Randbereich der Hefezelle, was demnach ebenfalls eine Bindung an die Zellwand darstellen könnte.

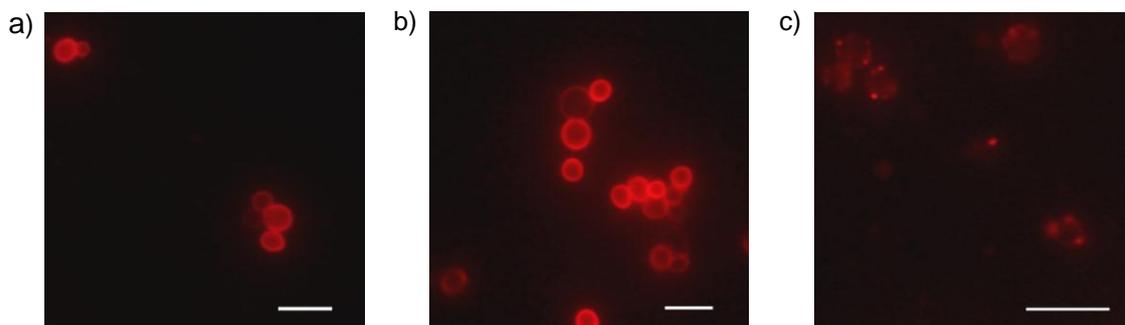


Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 nach 2 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}/K28-mCherry^Δ. Messbalken: 10 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit ist in Klammern angegeben.

- Intakte Zellen nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}, Proteinkonzentration: 1,4 μ g/ml (1/11 s, 50fache Vergrößerung)
- Intakte Zellen nach Inkubation mit K28-mCherry^Δ, Proteinkonzentration: 1,4 μ g/ml (1/11 s, 50fache Vergrößerung)
- Sphäroplasten nach Inkubation mit osmotisch stabilisiertem K28-mCherry^Δ Konzentrat (1.5 s, 100fache Vergrößerung)

Die Zellwandbindung stellt den ersten Schritt der K28-Intoxikation dar und erfolgt Energieunabhängig. Die anschließende Toxin-Internalisierung durch Endozytose ist jedoch ein Energie-abhängiger Prozess und konnte durch Zugabe eines metabolischen Inhibitors wie Azid verhindert werden (Heiligenstein, 2008). Entsprechend sollte diese Behandlung keinen Einfluss auf die Bindung von K28-mCherry^{HDEL} an die Hefezellwand ausüben. Dazu wurden Zellen des hypersensitiven Hefestamms 192.2d mit K28-mCherry^{HDEL} und Natriumazid in einer Endkonzentration von 1 mM inkubiert. Diese Konzentration sollte die Lebensfähigkeit der Hefen nicht beeinträchtigen und dennoch einen Effekt auf die Internalisierung von Killertoxinen zeigen (Weiler, 2002; Foury *et al.*, 1981). Wie Abb. 39 zeigt, führte die Zugabe des metabolischen Inhibitors Azid nicht zu einer Veränderung des K28-mCherry^{HDEL}-Fluoreszenzmusters.

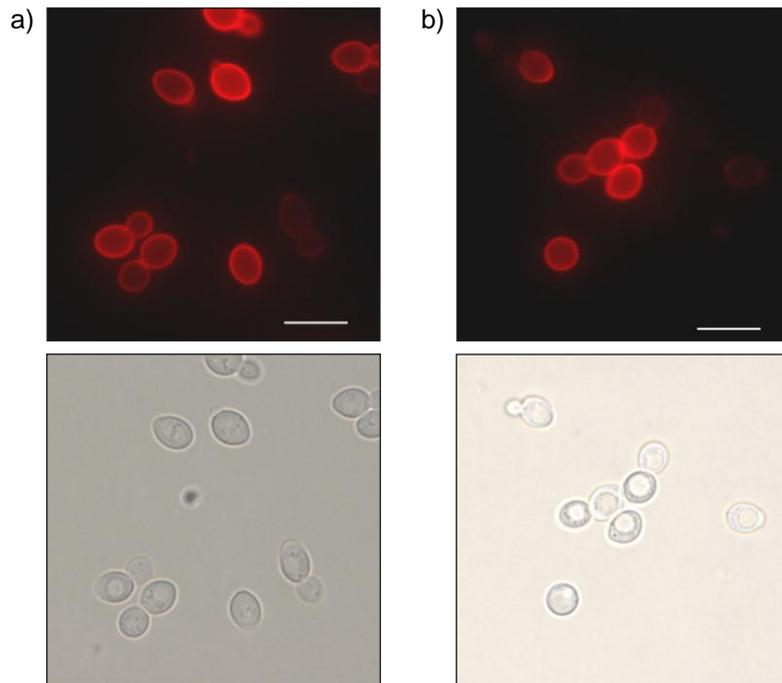


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* 192.2d nach 2 h Inkubation K28-mCherry^{HDEL}: Einfluss des metabolischen Inhibitors Azid. Nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat in Inkubationspuffer (20 °C, 2 h, 60 rpm) und nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Natriumazid wurde dem Inkubationsansatz in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Messbalken: 10 µm. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). 100fache Vergrößerung. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzbilder ist in Klammern angegeben.

- a) Kontrollansatz ohne Azid (1/25 s)
- b) Inkubationsansatz mit 1 mM NaN₃ (1/18 s)

Die Zellwandbindung von Killertoxinen wie WmKT von *Williopsis saturnis* var. *mrakii* oder K1 aus *S. cerevisiae* wird durch den extrazellulären pH-Wert bestimmt (Guyard *et al.*, 2002; Magliani *et al.*, 1997). Analog könnte die Zellwandbindung von K28 ebenfalls durch den pH-Wert beeinflusst werden. Die pH-Abhängigkeit der Toxinwirkung konnte bereits auf die Interaktion mit dem Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran zurückgeführt werden (Spindler, 2004). Eine Erhöhung des pH-Wertes des Inkubationspuffers hatte auch Auswirkungen auf die Bindung von K28-mCherry^{HDEL} an die Zellwand (Abb. 40). Im Vergleich zum optimalen pH-Wert von 4,7 nahm die Belichtungszeit bereits bei einem pH von 5,5 zu, was auf eine Abnahme der Fluoreszenzintensität hindeutet. Auch das ringförmige Fluoreszenzmuster veränderte sich hin zu einer eher punktuellen Fluoreszenz im Zellrandbereich, womit eine pH-Abhängigkeit der K28-mCherry^{HDEL}-Bindung an die Zelloberfläche belegt ist. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Bindung von K28-mCherry^{HDEL} an den K28-Primärrezeptor der Zellwand hin, wobei eine Interaktion mit dem Sekundärrezeptor Erd2p nicht auszuschließen ist. Die starke periphere Fluoreszenz ist jedoch vermutlich auf eine Anlagerung an die Zellwand zurückzuführen.

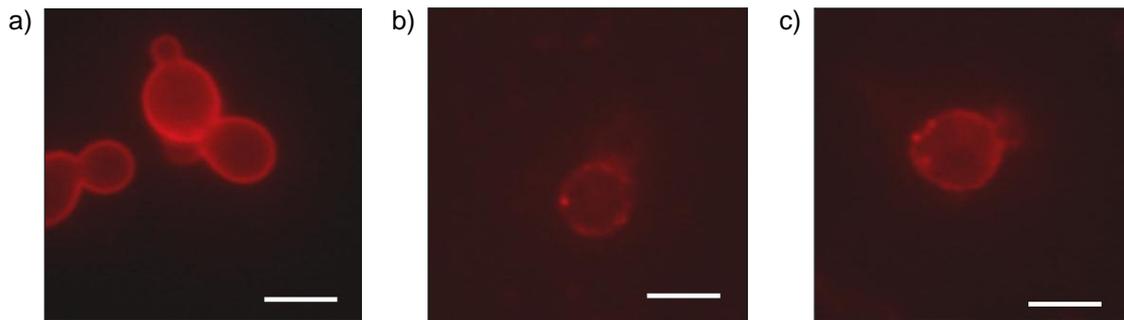


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 nach 2 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}: Einfluss des pH-Werts. Die Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} Konzentrat erfolgte in Inkubationspuffer (20 °C, 2 h, 60 rpm) mit unterschiedlichen pH-Werten. Nach zwei Waschschritten wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am Biozero BZ-8000 Mikroskop (KEYENCE) durchgeführt. Messbalken: 5 µm. 100fache Vergrößerung. Die Belichtungszeit ist in Klammern angegeben.

- a) pH 4,7 (1/11 s)
- b) pH 5,5 (1/1.2 s)
- c) pH 6 (1/1.3 s)

3.2.2.3. Bedeutung der β -Untereinheit für die Zellbindung fluoreszenzmarkierter K28-Toxinvarianten

Um auszuschließen, dass die Bindung der fluoreszierenden K28-Toxinchimären an die Oberfläche der Hefezellen durch die fluoreszierenden Proteine selbst bedingt ist, wurden als Kontrolle mCherry aber auch mTFP ohne K28-Fusion eingesetzt. Weder die Inkubation von Hefezellen mit mCherry^{HDEL}, mTFP^{HDEL} noch mCherry^A führte zu nachweisbaren Fluoreszenzsignalen. Auch Sphäroplasten zeigten nach Inkubation mit den Fluoreszenzproteinen keine punktuelle Fluoreszenz, wie sie nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} beobachtet werden konnte (Abb. 37). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Bindung der K28-Toxinvarianten an die Hefezellwand durch die fluoreszierenden Proteine (mCherry, mTFP) verursacht wird.

Die bisherigen Experimente ergaben, dass weder das C-terminale HDEL-Signal noch die Fluoreszenzproteine für die starke Fluoreszenz des Zellrandbereichs, womöglich der Zellwand, verantwortlich sind. Um zu untersuchen, ob die Bindung der Toxinchimären an die Zellperipherie durch die β -Untereinheit vermittelt wird, sollte β -mCherry^{HDEL} zu Inkubationsexperimenten eingesetzt werden. Da die Expression von β -mCherry^{HDEL} in *P. pastoris* durch Fermentation nicht erfolgreich war, wurde die heterodimere K28-Variante K28-mCherry^{HDEL} mit reduzierenden Agenzien wie Mercaptoethanol (1,6 %) oder DTT (10 mM) versetzt.

Dies führte zu einer Reduktion der Disulfidbrücke, wodurch die α -Untereinheit (10,7 kDa) von β -mCherry^{HDEL} (37,8 kDa) größtenteils getrennt wurde (Abb. 41 a). Die Fluoreszenzmikroskopie von β -mCherry^{HDEL} behandelten Hefezellen ergab wiederum ein starkes Signal im Zellrandbereich (Abb. 41 b). Somit konnte die K28 β -Untereinheit als Zellwand-bindende Komponente identifiziert werden. Weder das HDEL-Signal noch das Fluoreszenzprotein oder die α -Untereinheit bedingen die starke Zellwand-Fluoreszenz von K28-mCherry^{HDEL}.

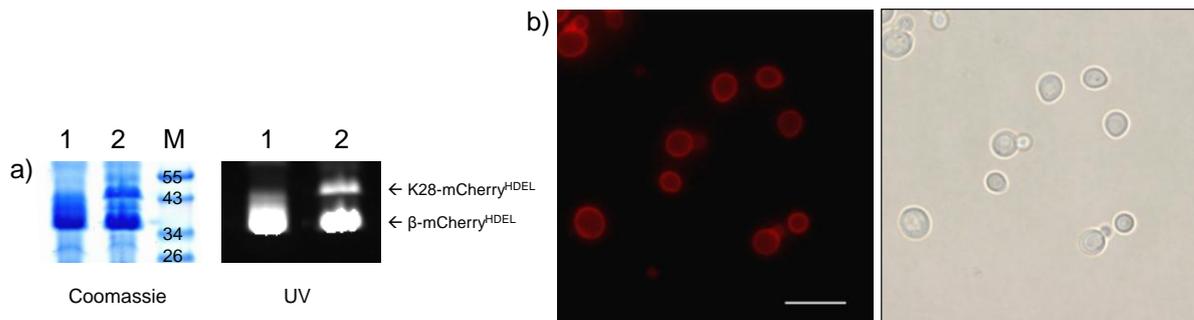


Abb. 41: β -mCherry^{HDEL}: Nachweis des Fusionsproteins im SDS-Gel und Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* nach β -mCherry^{HDEL}-Inkubation. a) K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat wurde mit 1,6 % Mercaptoethanol versetzt und im SDS-Gel aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte durch Coomassiefärbung sowie Detektion unter UV-Licht.

(1) 1,6 % Mercaptoethanol

(2) Kontrolle ohne Reduktionsmittel

(M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas).

b) K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat wurde mit 1,6 % Mercaptoethanol versetzt und mit *S. cerevisiae* BY4742 inkubiert. Nach 2 h wurden die Zellen zweimal gewaschen und zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. 100fache Vergrößerung. Messbalken: 10 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit betrug 1/20 s.

3.2.2.4. Nachweis von K28-mCherry^{HDEL} in intrazellulären Kompartimenten

Wie aus den vorherigen Untersuchungen deutlich wird, konnte nach Behandlung sensibler Hefezellen mit K28-mCherry^{HDEL} keine intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenzproteine mCherry^{HDEL} und mTFP^{HDEL} sollten durch Bindung an den membranständigen HDEL-Rezeptor Erd2p von Sphäroplasten aufgenommen und retrograd bis in das ER transportiert werden. Diese Theorie wurde durch Zellfraktionierungsstudien von GFP^{HDEL} behandelten Sphäroplasten bestätigt (Spindler, 2004). Fluoreszenzmikroskopisch konnte jedoch dieser Nachweis auch für mCherry^{HDEL} und mTFP^{HDEL} nicht erbracht werden, was vermutlich durch die geringe Menge an internalisierten Proteinen bedingt ist.

Um auszuschließen, dass die Inkubationsdauer von 2 h zu gering war, um eine nachweisbare Menge an K28-Chimären in den intrazellulären Kompartimenten fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, wurden die Zellen 16 h mit K28-mCherry^{HDEL} inkubiert, gewaschen und zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

Wie Abb. 42 b) zu entnehmen ist, wurde keine intrazelluläre Fluoreszenz beobachtet. Im Vergleich zu einer Inkubationsdauer von nur 5 min (Abb. 42 a) war kein Unterschied zu erkennen. Des Weiteren zeigten Zellen, welche nach zweistündiger Toxininkubation und der Entfernung nicht gebundenen Toxins für weitere 2 oder 3 d inkubiert wurden, keine intrazellulären Signale, sondern weiterhin die bereits beschriebene periphere Fluoreszenz (Abb. 42 c und d).

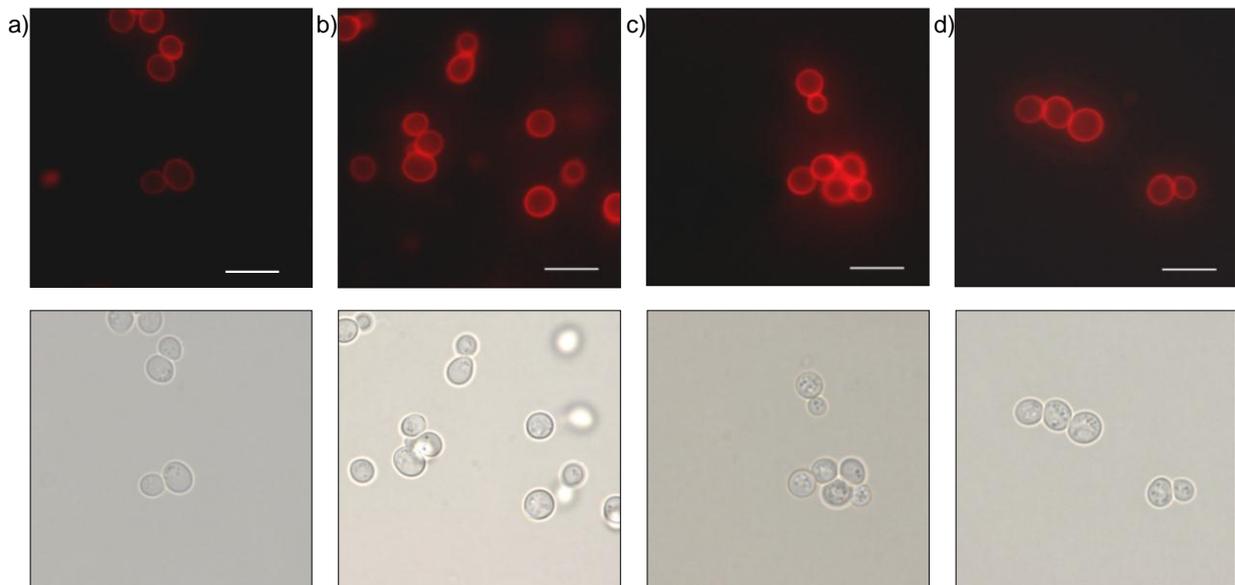


Abb. 42: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. BY4742 wurde nach Inkubation mit Toxininkonzentrat zweimal gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

a) nach 5 min Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} (1/20 s)

b) nach 16 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} (1/45 s)

BY4742 wurde 2 h mit Toxininkonzentrat inkubiert und nach zweimaligem Waschen in Inkubationspuffer kultiviert (20 °C, 60 rpm).

c) 48 h nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} (1/15 s)

d) 72 h nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} (1/18 s)

100fache Vergrößerung. Messbalken: 10 µm. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit wurde der jeweiligen Toxincharge angepasst und ist in Klammern angegeben.

Die aufgenommene Toxinmenge scheint somit unter der fluoreszenzmikroskopischen Nachweisgrenze zu liegen. Die K28-mCherry^{HDEL}-Inkubation von Deletionsmutanten, welche Defekte im retrograden Transport aufweisen, sollte zu einer Akkumulation des Toxins in bestimmten Kompartimenten führen: Eine $\Delta pmr1$ -Deletionsmutante ist K28-resistent und akkumuliert das Toxin aufgrund der veränderten Calciumkonzentration im ER, verursacht durch die Deletion der Ca^{2+}/Mn^{2+} P-Typ ATPase Pmr1p (Heiligenstein *et al.*, 2006). Ein intrazelluläres K28-mCherry^{HDEL} Signal konnte jedoch auch in dieser Mutante nicht detektiert werden (Abb. 43 a). Auch eine anschließende Sphäroplastierung, wobei die starke Zellwandfluoreszenz entfernt wurde, ergab keine intrazelluläre Fluoreszenz.

Da ein Teil des aufgenommenen Toxins zur Vakuole transportiert wird, sollte eine Deletionsmutante mit Defekten im vesikulären Transport vom Golgi zur Vakuole getestet werden. Die Phosphatidylinositol-3-kinase Vps34p („vacuolar protein sorting“) ist als Bestandteil eines multimeren Komplexes an der Golgi/Endosomen-Membran assoziiert und am vakuolären Transport beteiligt (Stack *et al.*, 1993, Horazdovsky *et al.*, 1995). $\Delta vps34$ zeigt eine Hypersensitivität gegenüber K28, da das Toxin retrograd zum ER transportiert und nicht mehr teilweise zur Vakuole transportiert und degradiert werden kann (Heiligenstein, 2008). Die Deletion von *VPS34* hatte jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf die Nachweisbarkeit von intrazellulärem K28-mCherry^{HDEL} (Abb. 43 b).

In der Vakuole herrscht ein niedriger pH-Wert, der zu einem Verlust der Fluoreszenz von mCherry führen könnte. Daher wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Ammoniumchlorid behandelt, um durch Erhöhung des pH-Wertes in der Vakuole lokalisiertes Toxin detektieren zu können (N. Touret, persönliche Mitteilung). Die Erhöhung des pH-Werts ermöglichte jedoch nicht den intrazellulären Toxinnachweis. mCherry wurde als säurestabiles Protein beschrieben und als Tag zur Analyse der lysosomalen Degradation etabliert. Das Protein fluoresziert daher auch bei niedrigen pH-Werten, wie in späten Endosomen (pH 5,5) oder der Vakuole/den Lysosomen (pH 4,7) (Pankiv *et al.*, 2007).

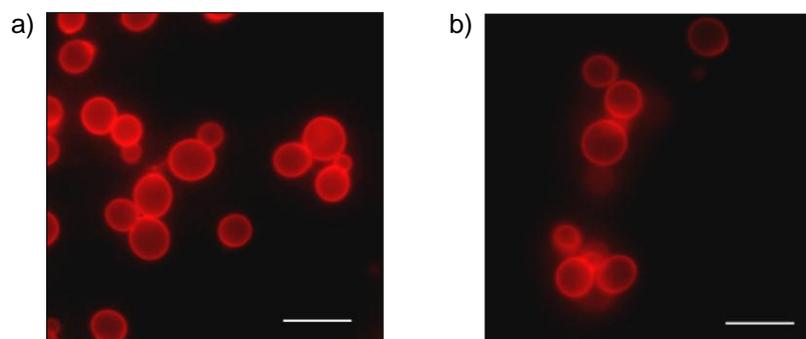


Abb. 43: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* $\Delta pmr1$ und $\Delta vps34$ nach 2 h Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. 100fache Vergrößerung. Messbalken: 10 μm . Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit wurde der jeweiligen Toxincharge angepasst und ist in Klammern angegeben.

- a) $\Delta pmr1 + \text{K28-mCherry}^{\text{HDEL}}$ (1/15 s)
- b) $\Delta vps34 + \text{K28-mCherry}^{\text{HDEL}}$ (1/50 s)

Eine weitere Möglichkeit die Menge an internalisiertem Toxin zu erhöhen, stellt die Überexpression des Toxinrezeptors Erd2p dar. Wie bereits gezeigt werden konnte, führt die Überexpression von Erd2p zu einer gesteigerten K28-Sensitivität (Heiligenstein, 2008). Diese hatte jedoch keine Auswirkung auf die Nachweisbarkeit von intrazellulärem K28-mCherry^{HDEL}.

Die Aufnahme von K28 erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Da dies ein Temperatur-abhängiger Prozess ist, sollte durch Temperaturerhöhung auf das Optimum von 30 °C die K28-Aufnahme gesteigert werden können. Allerdings ermöglichte diese Steigerung nicht den Nachweis von endozytierten K28-Toxinchimären. Die Temperatur (4 °C, 20 °C, 30 °C) hatte keinen Einfluss auf den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von K28-mCherry^{HDEL}. Des Weiteren wurde die Zusammensetzung des Inkubationspuffers hinsichtlich der Glukose- und Calciumkonzentration abgewandelt. Beide Bestandteile sind essentiell zur Endozytose. Ihre Variation führte jedoch nicht zur Detektierbarkeit von intrazellulärem K28-mCherry^{HDEL}.

Im Gegensatz zu den erhaltenen Ergebnissen, wonach K28-mCherry^{HDEL} intrazellulär nicht nachweisbar war, konnte die Endozytose von fluoreszenzmarkiertem α -Faktor mikroskopisch verfolgt werden (Toshima *et al.*, 2006). Auch die Inkubation von Hefezellen mit K28-mCherry^{HDEL} nach diesem Protokoll, durchgeführt bei pH 7 und pH 4,7, führte nicht zu intrazellulären K28-mCherry^{HDEL} Signalen.

3.2.2.5. Inkubation von Hefezellen mit K28-mTFP^{HDEL}

Neben K28-mCherry^{HDEL} zeigte auch die K28-Toxinchimäre mit C-terminaler mTFP-Fusion biologische Aktivität. K28-mTFP^{HDEL} war in der Lage, sensitive Hefen abzutöten, was im Agardiffusionstest bestätigt werden konnte (Abb. 31). Die Fluoreszenzintensität des K28-mTFP^{HDEL} Konzentrates war zwar deutlich schwächer als die der mCherry-Variante, überstieg aber die K28-GFP^{HDEL}-Fluoreszenz. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von K28-mTFP^{HDEL} behandelten Hefezellen zeigen ebenfalls ringförmige Signale im Zellrandbereich, die teilweise punktuelle Cluster bilden, was eventuell auf eine Bindung an den HDEL-Rezeptor auf Ebene der Plasmamembran hindeuten könnte. Intrazelluläre Signale waren nicht zu detektieren (Abb. 44).

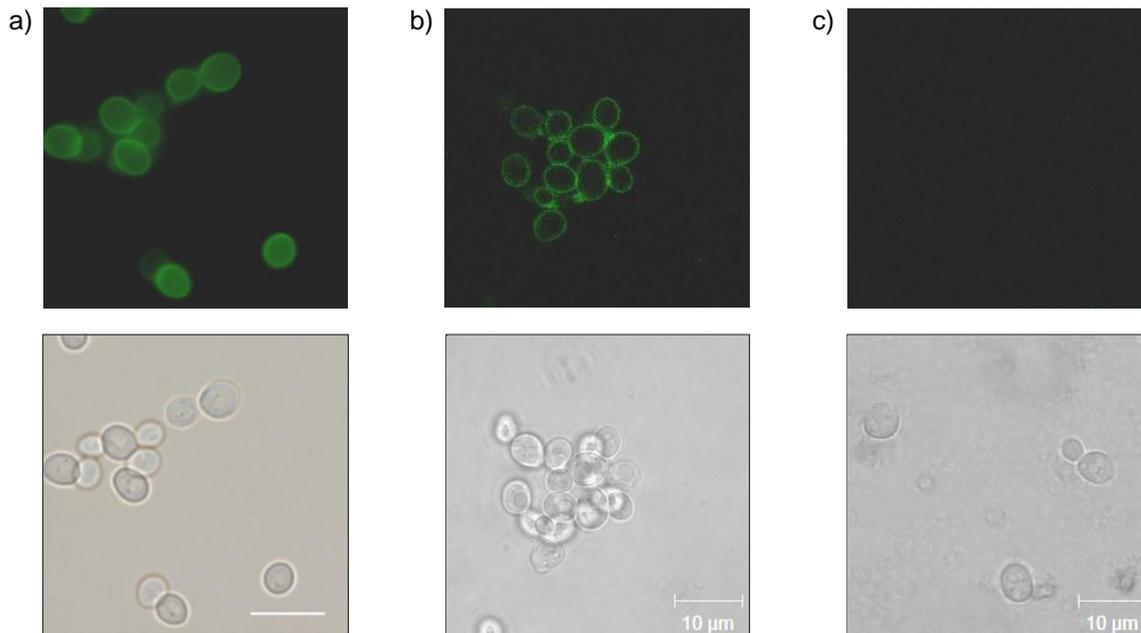


Abb. 44: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 nach 2 h Inkubation mit K28-mTFP^{HDEL}. *S. cerevisiae* BY4742 wurde nach 2 h Inkubation mit K28-mTFP^{HDEL} Konzentrat in Inkubationspuffer bei 20 °C, 60 rpm und zweimaligem Waschen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dargestellt sind mTFP-Fluoreszenz und die entsprechende Hellfeldaufnahme. 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 µm. Mikroskop: a) Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Belichtungszeit: 1.2 s. b) und c): cLSM 510 Meta (Zeiss), average: 4, pinhole: 316 µm, Laser 488 nm: 6,1 %.

- a) BY4742 + K28-mTFP^{HDEL}
- b) BY4742 + K28-mTFP^{HDEL}
- c) BY4742 + K28-mTFP^{HDEL} + 2 mM Bromphenolblau

Die Verwendung von mTFP anstelle von mCherry bietet den Vorteil, extrazellulär vorhandenes und nicht internalisiertes K28-mTFP^{HDEL} gezielt quenchen zu können: Bromphenolblau ist als Quencher von grün fluoreszierenden Proben beschrieben. Da der Farbstoff aufgrund seiner Hydrophilie kaum membrangängig ist, wurde er bereits erfolgreich zum Quenchen extrazellulärer Fluoreszenz (FM1-43) bei Untersuchung synaptischer Vesikel eingesetzt (Harata *et al.*, 2006).

Durch Quenchen von nicht aufgenommenen Toxinchimären sollte die Detektion von intrazellulärem Toxin vereinfacht werden: Die starke extrazelluläre Fluoreszenz, die vermutlich aus einer Bindung des Toxins an die Zellwand resultiert, wird unterdrückt. Dies erlaubt eine Erhöhung der Belichtungszeiten während der Fluoreszenzmikroskopie und ermöglicht damit die Visualisierung intrazellulärer Toxinchimäre. Wie Abb. 44 c) zu entnehmen ist, führte die Zugabe von Bromphenolblau zu einem vollständigen Verlust der Fluoreszenzsignale. Auch durch Variation der Einstellungen konnten keine intrazellulären Signale detektiert werden.

Die Ergebnisse der Inkubationsexperimente sind in Tab. 17 zusammengefasst. Toxinfusionen, welche die β -Untereinheit enthielten, zeigten nach Inkubation mit Hefezellen eine starke Fluoreszenz im Bereich der Zellperipherie. Intrazelluläre Signale konnten mit keiner Variante erhalten werden, auch nicht nach Entfernung der Zellwand durch Sphäroplastierung.

Tab. 17: Zellbindung verschiedener fluoreszierender K28-Toxinvarianten und Kontrollen. K28-Toxinchimäre und Kontrollen wurden nach 2 h Inkubation mit *S. cerevisiae* BY4742 fluoreszenzmikroskopisch untersucht (FP: Fluoreszenzprotein, mCherry oder mTFP)

Toxinvariante/Fluoreszenzprotein	Zellbindung/ periphere Fluoreszenz	Intrazelluläre Fluoreszenz
α/β -FP ^{HDEL}	+	-
α/β -FP ^Δ	+	-
β -FP ^{HDEL}	+	-
FP ^{HDEL}	-	-
FP ^Δ	-	-

3.2.3. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von HeLa-Zellen nach Behandlung mit fluoreszierenden K28-Chimären

Die Fluoreszenzmarkierung von Toxinen eröffnet die Möglichkeit, deren Aufnahme und intrazellulären Transport in Echtzeit verfolgen zu können. Fluoreszierende Cholera-Toxin-Chimäre wurden von Vero-Zellen effizient endozytiert und konzentrierten sich in perinukleären Strukturen (Tinker *et al.*, 2005). Wie das Cholera-Toxin besitzt auch K28 ein ER-Retentionssignal, was einen effizienten retrograden Transport gewährleistet. Zudem interagiert K28 über dieses Motiv mit seinem Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran, dem HDEL-Rezeptor Erd2p (Dausend, 2010). Falls die Säugerhomologe zu Erd2p ebenfalls in der Plasmamembran kolokalisieren, könnten sie auch dort als K28-Rezeptor fungieren.

Die Wirkung von K28 auf höhere eukaryotische Zellen wurde bisher in mehreren Arbeiten adressiert. Eine große Schwierigkeit stellten dabei die Applikationsbedingungen dar: K28 hat ein Temperaturoptimum von 20 °C und ein pH-Optimum von 4,7. Diese Bedingungen weichen stark von den optimalen Kulturbedingungen für Säugerzelllinien ab (pH 7,4; 37 °C; 5 % CO₂). In den bisherigen Experimenten wurde daher versucht, einen Kompromiss

zwischen den optimalen Bedingungen für K28 und der verwendeten Zelllinie zu finden. Allerdings konnte auch durch weitreichende Variation der Inkubationsbedingungen, der Zelllinien und der Toxizitätstests kein signifikanter toxischer Effekt nachgewiesen werden (Spindler, 2004; Kelkel, 2009; Klein, 2009). Es gelang jedoch die Aufnahme von K28^{HDEL}RFLAG/His durch Zellaufschluss und Western-Analyse zu belegen (Klein, 2009). Die Aufnahme einer K28-Variante mit C-terminalem KDEL-Signal konnte dabei nicht nachgewiesen werden. In Säugerzellen wurden drei KDEL-Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität identifiziert, wobei Erd22 und vor allem Erd23 eine deutlich höhere Affinität zu HDEL- als zu KDEL-Motiven aufwiesen (Raykhel *et al.*, 2007). Daher wurde für die Durchführung der Inkubationsexperimente eine fluoreszenzmarkierte K28-Variante mit C-terminalem HDEL-Signal gewählt: HeLa-Zellen wurden mit K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat, welches mit PBS 1 : 5 verdünnt wurde, im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach 1 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Mounting-Medium + DAPI überschichtet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie in Abb. 45 dargestellt ist, fluoreszierten die Zellen im Randbereich, wobei eine leichte Clusterbildung erkennbar war. Ein ähnliches Bild ergab sich auch nach der Inkubation mit K28-mCherry^Δ. Alle weiteren getesteten Toxinvarianten und Kontrollen (aufgeführt in Tab. 17) führten nicht zu einem Fluoreszenzsignal, welches sich von der Pufferkontrolle unterschied. Insgesamt war die Fluoreszenzintensität sehr gering, was auch einen Grund für das fehlende Signal nach der Inkubation mit der zu K28-mCherry^{HDEL} analogen K28-mTFP^{HDEL} Toxinvariante darstellen könnte. Nur die beiden Chimären mit der stärksten Fluoreszenz (vgl. Tab. 16) führten zu einer Fluoreszenz im Randbereich der HeLa-Zellen. Intrazellulär konnte kein Toxin nachgewiesen werden: Zum Einen wurde eine Trypsin-Behandlung durchgeführt, in deren Folge keine Fluoreszenzsignale mehr detektierbar waren; zum Anderen ergab ein Zellaufschluss mit anschließender Western-Analyse keine K28-mCherry-spezifischen Banden. Somit scheint K28-mCherry^{HDEL} nicht aufgenommen worden zu sein. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer führte auch bei der Pufferkontrolle vermutlich aufgrund des niedrigen pH-Wertes zum Absterben der Zellen. Toxizitätstests, welche durch Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen Rückschlüsse auf die Zellvitalität zulassen (XTT-Test, Sigma), konnten eine toxische Wirkung von K28-mCherry^{HDEL} auf HeLa-Zellen nicht belegen. Wie zuvor beschrieben, wies die Negativkontrolle ebenfalls eine toxische Wirkung auf (Kelkel 2009, Klein 2009).

Insgesamt deuten die Ergebnisse eher auf eine unspezifische Anlagerung der K28-mCherry-Chimären an HeLa-Zellen hin: Intrazellulär konnte kein Toxin nachgewiesen werden. Weiterhin scheint das Toxin vor allem an der Grenzfläche zwischen adhären Zellen und Deckglas unspezifisch zu aggregieren.

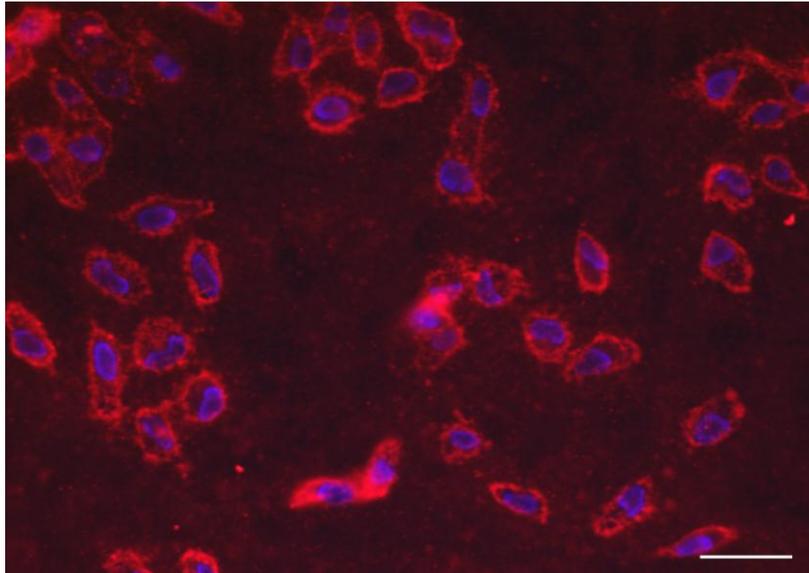


Abb. 45: Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL}. HeLa-Zellen wurden 1 h mit K28-mCherry^{HDEL}-Konzentrat, 1 : 5 mit PBS verdünnt, inkubiert, mit PBS gewaschen und mikroskopiert. Die Zellkerne wurden durch im Mounting-Medium enthaltenes DAPI gefärbt. 20fache Vergrößerung. Messbalken: 50 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit (mCherry-Fluoreszenz) betrug 1/11 s.

3.3. Untersuchungen zur Erd2p-Kolokalisation an der Plasmamembran

Wie im vorherigen Kapitel dargestellt, konnten die Internalisierung und der intrazelluläre Transport von K28 mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Toxinvarianten nicht visualisiert werden. Weder für K28-mCherry^{HDEL} noch für K28-mTFP^{HDEL} wurden intrazelluläre Signale erhalten. Um dennoch den Toxintransport fluoreszenzmikroskopisch analysieren zu können, sollte daher der K28-Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran durch GFP-Fusion zur Visualisierung des Toxintransportes herangezogen werden. So konnte auch die Charakterisierung des GFP-markierten α -Faktor-Rezeptors Ste2p-GFP Aufschluss über die am Rezeptor-Transport beteiligten Proteine liefern (Stefan & Blumer, 1999).

Der K28-Sekundärrezeptor Erd2p ist hauptsächlich in der Golgi-Membran und in Membranen des ER/Golgi-Intermediär-Kompartimentes (ERGIC) lokalisiert und dort für die Rückführung luminaler ER-Proteine in das ER verantwortlich. Entscheidende Hinweise auf eine Kolokalisation an der Plasmamembran ergaben Studien mit dem GFP-markierten HDEL-Rezeptor sowie mCherry-markierten Markerproteinen der Plasmamembran. Des Weiteren konnte mit Hilfe eines Wachstumstests, welcher auf dem „ras-recruitment“-System beruht, die Plasmamembranlokalisierung von Erd2p nachgewiesen werden (Dausend, 2010). Im Folgenden sollte Erd2p als Sekundärrezeptor von K28 und dessen endozytotische Internalisierung bestätigt werden. Untersuchungen zur Aufnahme von Kar2p sollten zeigen, dass die postulierte Erd2p-vermittelte Internalisierung auch für einen natürlichen Rezeptor-Liganden gilt.

3.3.1. Erd2-SNAP-Tag Fusionen zum Nachweis der Erd2p-Plasmamembranlokalisation

Um eindeutig die Kollokalisierung von Erd2p in der Plasmamembran nachzuweisen, wurde das „SNAP-Surface“-System genutzt. Das SNAP-Tag ist eine Variante des DNA-Reparaturproteins O^6 -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT) und reagiert spezifisch mit Benzylguanin, indem irreversibel die Benzylgruppe von O^6 -Benzylguanin auf einen Cysteinrest der Alkyltransferase unter Bildung einer stabilen Thioether-Bindung übertragen wird (Abb. 14; Keppler *et al.*, 2003; Keppler *et al.*, 2004). Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Substraten, welche nicht membrangängig sind, können spezifisch extrazellulär exponierte AGT-Fusionen detektiert werden. Dieses System wurde für Säugerzellen etabliert. In *S. cerevisiae* fand es bisher Anwendung zur Untersuchung der Septin-Stabilität sowie des Zellwandproteins Sag1p (McMurray *et al.*, 2008; Vivero-Pol *et al.*, 2005). In Säugerzellen ermöglichte der Einsatz nicht membrangängiger Substrate die Visualisierung der Rezeptorinternalisierung (Jacquier *et al.*, 2006). Bisher wurden in Hefezellen keine SNAP-markierten Plasmamembranproteine beschrieben. Daher sollte zunächst eine Positivkontrolle, ein *S. cerevisiae*-Plasmamembranprotein fusioniert mit dem SNAP-Tag, etabliert werden. Das SNAP-Tag muss dabei auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exponiert sein, so dass eine Reaktion mit dem fluoreszenzmarkierten, nicht membrangängigen Substrat möglich ist. Als Positivkontrolle wurde Snc1p gewählt. Das Vesikel-assoziierte Membranprotein reguliert die Fusion exozytischer Vesikel an der Zelloberfläche, vor allem in der wachsenden Knospe. Anschließend wird Snc1p schnell internalisiert und zu endosomalen und Golgi-Kompartimenten transportiert, wo es in neue Vesikel eingebaut wird (Lewis *et al.*, 2000). GFP-Snc1 konnte in wildtypischen Hefezellen und vermehrt in Endozytose-Mutanten wie $\Delta end3$ in der Plasmamembran lokalisiert werden. Zudem wurde eine Snc1-Suc2-Fusion als Reporter in einem kolorimetrischen Invertase-Assay genutzt: Das Enzym Invertase (Suc2p) war dabei an den extrazellulären C-Terminus von Snc1p fusioniert (Burston *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde das SNAP-Tag in Analogie dazu an den C-Terminus von Snc1p fusioniert und in wildtypischen Hefen sowie einer $\Delta end3$ -Deletionsmutante exprimiert (Abb. 46 a). Die Deletion führt zu einer deutlich verlangsamten Endozytose, da End3p an der Initiation der Aktinpolymerisation während der Endozytose beteiligt ist (Kaksonen *et al.*, 2005).

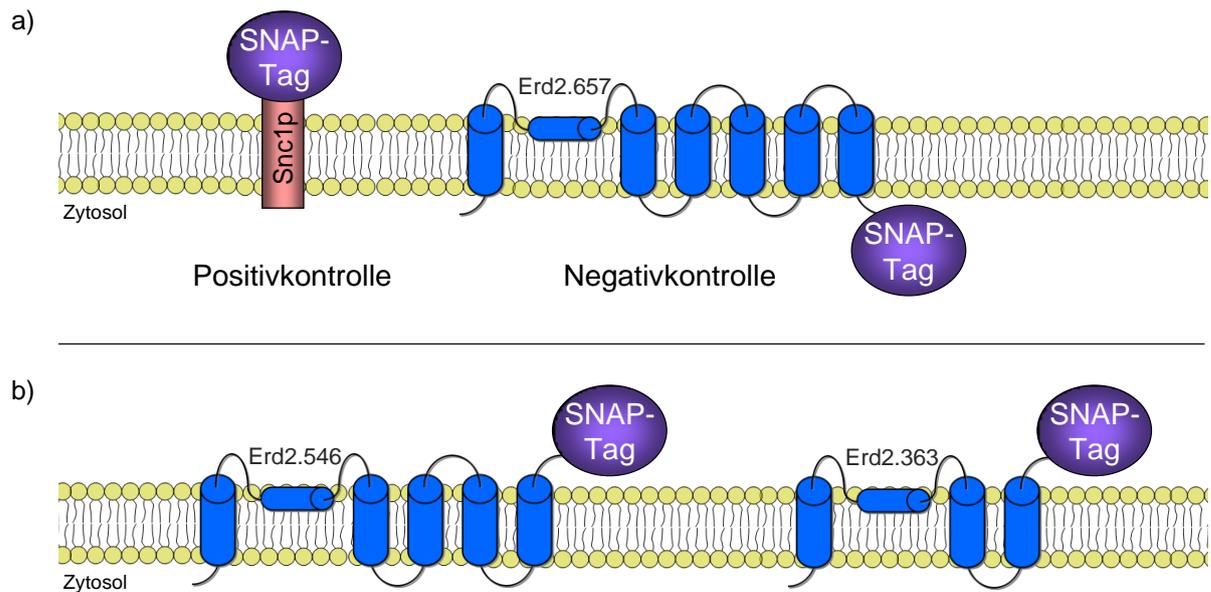


Abb. 46: Schematische Darstellung der SNAP-Tag-Fusionsproteine. **a)** Die Positivkontrolle besteht aus dem Membranprotein Snc1p, an dessen C-Terminus und somit extrazellulär das SNAP-Tag fusioniert ist. Als Negativkontrolle dient Erd2p, wobei das SNAP-Tag am zytosolischen C-Terminus angefügt wurde. **b)** Zum Nachweis einer Plasmamembranlokalisation wurde der Rezeptor Erd2p um eine (Erd2.546) oder drei (Erd2.363) Transmembran-Domänen verkürzt, so dass das C-terminale SNAP-Tag auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert ist.

Zunächst wurden die Zellen vor der SNAP-Tag Markierungsreaktion sphäroplastiert, was jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen führte (Klein, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Markierungsreaktion mit „SNAP-Surface Alexa Fluor 488“-Substrat optimiert. Es zeigte sich, dass auf eine Sphäroplastierung verzichtet werden kann; eine effiziente Markierung von Snc1-SNAP war sowohl in wildtypischen Hefezellen als auch in $\Delta end3$ -Deletionsmutanten zu beobachten. Das Fluoreszenzmuster entsprach dabei in beiden Hefestämmen dem von GFP-Snc1 (Burston *et al.*, 2009): Neben der Plasmamembranlokalisation, welche in wildtypischen und $\Delta end3$ -Zellen zu erkennen war, konnte Snc1p in wildtypischen Hefen auch in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 47).

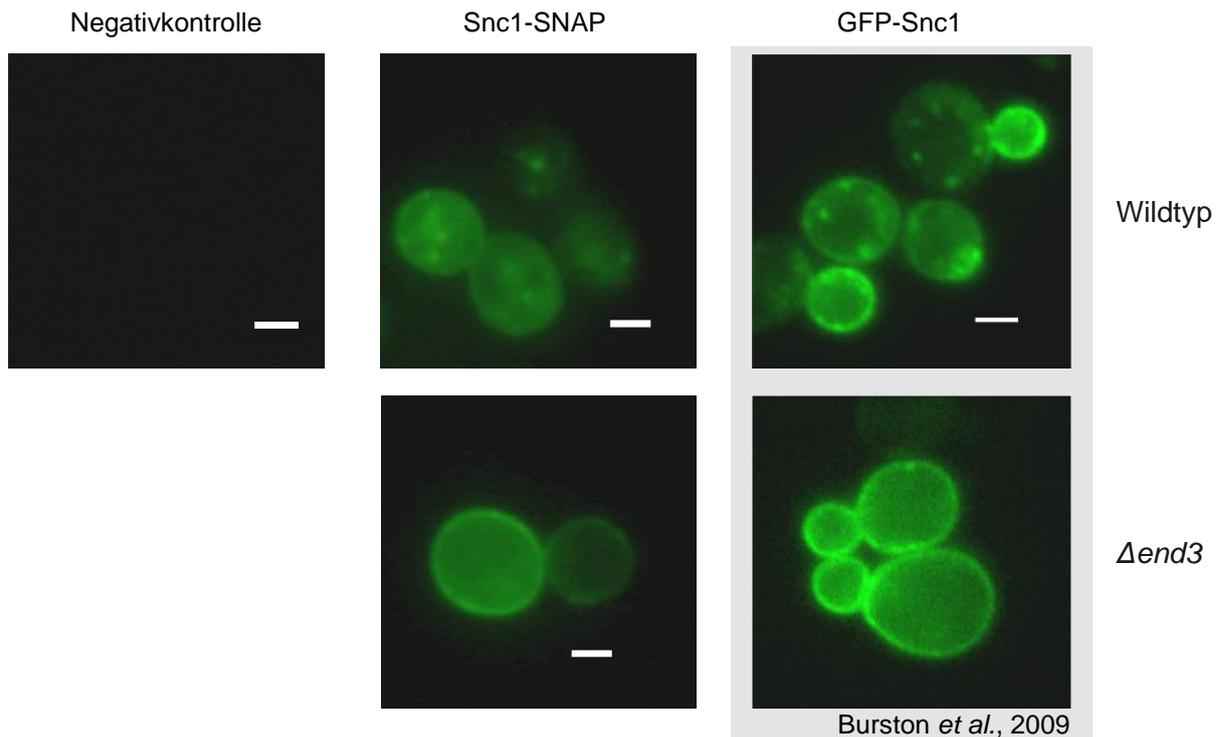


Abb. 47: Snc1-SNAP: Etablierung einer Positivkontrolle zum „SNAP-Tag surface“-System in *S. cerevisiae*. BY4742 [pRS316] (Negativkontrolle), BY4742 [pRS316 Snc1-SNAP] und $\Delta end3$ [pRS316 Snc1-SNAP] wurden in *ura d/o* Galaktose-Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und 40 min in 5 μ M „SNAP-Surface Alexa Fluor 488“-Lösung inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurde überschüssiges SNAP-Substrat entfernt. Zum Vergleich ist GFP-Snc1 dargestellt (Burston *et al.*, 2009). 100fache Vergrößerung. Messbalken: 2 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE). Die Belichtungszeit betrug 1,8 s (Wildtyp) bzw. 1 s ($\Delta end3$).

Nach Etablierung der Positivkontrolle Snc1-GFP zum „SNAP-surface“-System in *S. cerevisiae* wurde der K28-Rezeptor Erd2p mit dem SNAP-Tag fusioniert. Die Topologie-Analyse von Erd2p ergab, dass N- und C-Terminus im Zytosol lokalisiert sind (Dausend, 2010). Zur Markierungsreaktion muss das SNAP-Tag auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exponiert sein. Daher wurden sowohl der wildtypische Rezeptor als Negativkontrolle, wobei das SNAP-Tag im Zytosol lokalisiert ist, als auch um eine oder drei Transmembrandomänen verkürzte Formen kloniert (Abb. 46). Die Konstrukte, welche für die Rezeptorvarianten Erd2.657 (ohne Stopp-Codon), Erd2.546 (um eine TM-Domäne verkürzt) und Erd2.363 (um drei TM-Domänen verkürzt) kodieren (Gießelmann, 2007) wurden durch *EcoRI/XbaI*-Restriktion in den Vektor pRS316 Snc1-SNAP (Klein, 2009) eingebracht. Nach Transformation in BY4742 und $\Delta end3$ und Kultivierung in *ura d/o* Galaktose-Medium wurde die Markierungsreaktion mit „SNAP-Surface Alexa Fluor 488“-Substrat durchgeführt.

Allerdings konnten im Vergleich zur Negativkontrolle Erd2.657 keine spezifischen Fluoreszenzsignale detektiert werden. Das System der „SNAP-Tag Surface“-Markierung ist folglich für den Plasmamembran-Nachweis eines Proteins, welches nur in gringer Kopienzahl auf der Zelloberfläche vorhanden ist, vermutlich nicht geeignet. Dennoch konnte diese Methode durch Etablierung einer Positivkontrolle für den Einsatz in *S. cerevisiae* optimiert werden.

3.3.2. Kolokalisation von Erd2p und FM4-64

Da der Nachweis der Plasmamembranlokalisierung mit Hilfe des „SNAP-Tag surface“-System nicht gelang, sollten die Kolokalisation von Erd2p an der Plasmamembran und die Endozytose des Rezeptors durch Färbung der Hefezellen mit einem Plasmamembran- und Endosomenfarbstoff bestätigt werden. FM4-64 ist ein amphiphatischer Farbstoff, der an die Plasmamembran bindet und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Er passiert die endosomalen Kompartimente und färbt schließlich vakuoläre Membranen (Vida & Emr, 1995). Der rot fluoreszierende Farbstoff wird genutzt, um endosomale Kompartimente lokalisieren zu können. In Kombination mit GFP-markierten Proteinen, wie dem α -Faktor Rezeptor GFP-Ste2p oder anderen an der Endozytose beteiligten Komponenten wie Pan1-GFP, ermöglichte die Kolokalisation mit FM4-64 eine Aufklärung des zeitlichen Ablaufs der Endozytose (Holthuis *et al.*, 1998; Kaksonen *et al.*, 2005).

Zur Kolokalisation mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff FM4-64 wurde der K28-Rezeptor Erd2p C-terminal mit GFP fusioniert. Diese Rezeptorvariante ist weiterhin funktionell und wurde bereits erfolgreich zu fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt (Dausend, 2010). In diesem Fall wurde Erd2-GFP im Centromervektor pRS316 unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors P_{GAL1} exprimiert. Des Weiteren wurde ein Hefestamm genutzt, welcher Erd2p C-terminal fusioniert mit GFP unter Kontrolle des endogenen Promotors enthält. Die Erd2-GFP-Fusion entstand durch genomische Integration eines Konstrukts aus GFP-Tag und Markergen im C-Terminus des *ERD2*-ORF durch homologe Rekombination (Huh *et al.*, 2003). Die Fluoreszenzintensität war jedoch sehr schwach, daher konnte dieser Stamm nicht zu Kolokalisationsstudien genutzt werden (Dausend, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Rezeptorvarianten zu Kolokalisationsanalysen mit FM4-64 verwendet (Abb. 48). Die Färbung mit FM4-64 ergab eine ringförmige Fluoreszenz im Zellrandbereich, wobei es sich um die Plasmamembran handelt. Einzelne punktuelle Strukturen stellen Endosomen dar. Die vakuoläre Membran ist als ringförmiges Fluoreszenzmuster im Zellinneren zu erkennen (Vida & Emr, 1995).

Erd2-GFP zeigte eine punktuelle Fluoreszenz über die Zelle verteilt, wobei einzelne Foci auch im Zellrandbereich lokalisiert waren. Wurde Erd2-GFP unter dem Rezeptor-eigenen Promotor exprimiert, war die Fluoreszenzintensität sehr gering, so dass nur wenige punktuelle Strukturen detektiert werden konnten. Erd2p kommt nicht nur in Golgi, ER und der Plasmamembran vor, sondern auch in Komponenten des vesikulären und tubulären Transports zwischen diesen Kompartimenten. Bisher konnte jedoch nicht zwischen endozytierten und retrograd transportierten Erd2-GFP-Vesikeln und denen des anterograden Transportes unterschieden werden.

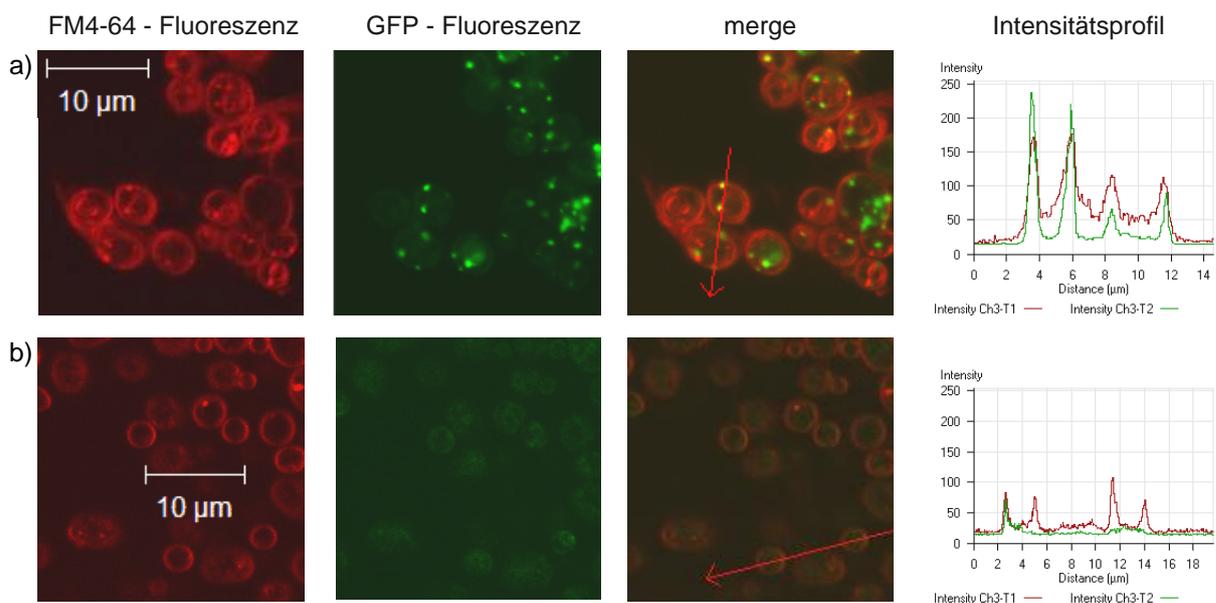


Abb. 48: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kolo-kalisation von Erd2-GFP und FM4-64. BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] (a) wurde in ura d/o Galaktose Medium, YBL040c GFP clone (b) in YPD bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, auf Concanavalin A-beschichteten Objektträgern immobilisiert und mit FM4-64 (8 nM) 90 s inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Laser Scanning Mikroskopie. 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 µm. Mikroskop: cLSM 510 Meta (Zeiss). (a): average: 16, pinhole (543 nm): 248 µm, pinhole (488 nm): 240 µm, Laser 543 nm: 9,1 %, Laser 488 nm: 10,1 %; (b): average: 8, pinhole (543 nm): 204 µm, pinhole (488 nm): 256 µm, Laser 543 nm: 9,1 %, Laser 488 nm: 10,1 %. Die Intensitätsprofile wurden mit der Software „Zeiss LSM Image Examiner“ erstellt.

Nach der Überlagerung der FM4-64 und GFP-Fluoreszenzen konnte sowohl nach Expression von Erd2-GFP unter Kontrolle des endogenen Promotors als auch des Promotors P_{GAL1} eine teilweise Kolo-kalisation von FM4-64 und Erd2-GFP beobachtet werden. Dabei überlagerten sowohl Erd2-GFP Signale des Zellrandbereichs als auch intrazelluläre Foci mit FM4-64. Die Kolo-kalisation wurde durch Intensitätsprofile bestätigt. Die vesikulären Strukturen waren somit durch Endozytose entstanden, was durch die Markierung mit FM4-64 belegt wurde.

Somit konnte der HDEL-Rezeptor Erd2p sowohl an der Plasmamembran als auch in endosomalen Kompartimenten lokalisiert werden, was die These der Plasmamembranlokalisation und Endozytose des Rezeptors bestätigt. Dem entspricht auch das Ergebnis der Mobilitätsanalyse von Erd2-GFP in einer $\Delta end3$ -Deletionsmutante mit Defekten in der Endozytose, was unter Punkt 3.4.3.2 aufgeführt ist: Diese Mutation, welche eindeutig dem Prozess der Endozytose zuzuordnen ist, reduzierte sowohl die Verweildauer von Erd2p als auch dessen Mobilität in Plasmamembrannähe.

3.3.3. Funktion des HDEL-Rezeptors Erd2p an der Plasmamembran

Die bisher beschriebene Funktion des Rezeptors besteht in der Rückführung HDEL-tragender luminaler ER-Proteine nach Modifikationen im Golgi-Komplex in das ER (Semenza *et al.*, 1990). Die Identifikation des HDEL-Rezeptors als Plasmamembranrezeptor für K28 führte zu einer detaillierten Untersuchung der Erd2p-Lokalisation, wobei eine Kolokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran bestätigt werden konnte (Punkt 3.3.2; Dausend, 2010; Heiligenstein, 2008; Denne 2003; Riffer *et al.*, 2002). Die Internalisierung des Erd2p/K28-Rezeptor/Liganden-Komplexes erfolgt schließlich durch Endozytose, deren Ablauf sowie die beteiligten Proteine im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert wurden (Punkt 3.4). Die Kolokalisation von Erd2p an der Plasmamembran wird vermutlich durch eine nicht vollständige Rückhaltung des Rezeptors in Golgi und ER verursacht. Ein entsprechender Rückhalte Mechanismus für Erd2p konnte bisher nicht identifiziert werden. Im Folgenden sollte die Funktion des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran adressiert werden. Wie für den Mannose-6-Phosphat Rezeptor beschrieben wurde, kann dieser Rezeptor neben der Erkennung von Mannose-6-Phosphat auf lysosomalen Hydrolasen und der Regulation deren Transportes in endosomale Kompartimente zusätzliche Funktionen an der Plasmamembran ausüben, wozu die Internalisierung von Plasminogen zählt (Godar *et al.*, 1999). Daher wurde untersucht, ob der HDEL-Rezeptor an der Plasmamembran ebenfalls weitere Funktionen ausübt, zu denen die Rückführung HDEL-tragender Liganden zählen könnte, oder ob die Kolokalisation des Rezeptors lediglich auf einen nicht ausreichenden Rückhalte Mechanismus im Golgi zurückzuführen ist.

3.3.3.1. Untersuchungen zur Aufnahme von Kar2^{HDEL} durch Sphäroplasten

Die Endozytose des Toxins K28 durch *S. cerevisiae* beinhaltet eine Interaktion seines β -C-terminalen HDEL-Motivs mit dem an der Plasmamembran lokalisierten HDEL-Rezeptor Erd2p. Die natürlichen Liganden des HDEL-Rezeptors sind luminaire ER-Proteine wie die Protein-Disulfid-Isomerase oder Kar2p, deren Rückführung in das ER nach Modifikationen im Golgi durch ein C-terminales HDEL-Signal gewährleistet wird. Um die Funktion des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran näher charakterisieren zu können, wurde untersucht, ob auch ein natürlicher Ligand, welcher extern appliziert wurde, durch Erd2p-vermittelte Endozytose aufgenommen und retrograd bis in das ER transportiert werden kann. Dieser Mechanismus könnte die Rückführung HDEL-markierter Proteine in das ER sicherstellen, auch wenn diese bereits die Plasmamembran erreicht haben.

Dazu wurde das luminaire ER-Chaperon Kar2p gewählt, welches als Homolog zu dem Säugerprotein BiP an der Proteintranslokation durch den Sec61 Komplex, der Proteinfaltung und der „unfolded protein response“ (UPR) beteiligt ist (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989; Simons *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 2011). Eine Deletion des *KAR2*-Gens ist letal; es existieren jedoch temperatursensitive Stämme, welche Mutationen in der ATPase- oder Substrat-Binde-Domäne von Kar2p besitzen.

Kar2p sollte heterolog exprimiert und gereinigt werden, um zur Inkubation mit Sphäroplasten eingesetzt werden zu können. Anschließend sollten die Internalisierung sowie der retrograde Transport des Proteins durch den HDEL-Rezeptor nachgewiesen werden. Um die Kar2p-Aufnahme bestimmen zu können, wurde eine temperatursensitive *kar2*-Mutante zu Internalisierungsexperimenten eingesetzt. Diese kann bei restriktiver Temperatur nur dann überleben, wenn Kar2p internalisiert und bis in das ER transportiert wird, wo es die Funktion des mutierten endogenen Kar2p erfüllt (Abb. 52). Die Vitalität der *kar2*-Sphäroplasten als Maß für die Aufnahme von Kar2p wurde durch Messung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Inkubationsmedium bestimmt (Respirationsassay), was eine sehr sensitive Methode zur Erfassung von mikrobiellen Wachstumsraten darstellt (Hutter & John, 2004; Velagapudi *et al.*, 2007; Wesolowski *et al.*, 2008).

Herstellung von Kar2^{HDEL} und Kar2^A

Um die Aufnahme von extern appliziertem Kar2p durch Sphäroplasten untersuchen zu können, musste Kar2p heterolog exprimiert und gereinigt werden. Analog zur Vorgehensweise wie unter Punkt 3.1 beschrieben, wurden zur Expression von Kar2p die Hefegattungen *K. lactis* und *P. pastoris* getestet, welche beide zur Sekretion heterologer Proteine in großem Maßstab eingesetzt werden. Die Sekretion wurde durch das Kar2p-eigene Sekretionssignal gesteuert, welches erfolgreich zum ER-Import weiterer Proteine eingesetzt wurde (Simpson *et al.*, 1999). Um eine Rückführung von Kar2p aus dem

Sekretionsweg in das ER-Lumen zu verhindern, wurde das C-terminale HDEL-Signal mit einem Argininrest maskiert, der erst im späten Golgi durch die Exopeptidase Kex1p entfernt wird. Sowohl *KAR2* mit C-terminaler HDELR-Sequenz als auch eine *KAR2*-Variante, deren C-terminales HDEL-Signal deletiert wurde, wurden mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen versehen, wobei genomische *S. cerevisiae* DNA als Template diente.

Zur Expression in *K. lactis* wurden die *KAR2*-Varianten durch *XhoI/NotI*-Restriktion in den Vektor pKLACpptoX-FLAG/His kloniert (Guida, 2007). Der Vektor wurde mit *SacI* linearisiert, so dass die Expressionskassette in das Genom von *K. lactis* in den Promotorbereich des *LAC4*-Lokus integrieren konnte. Zur Überprüfung der Integration wurde eine „Colony“-PCR durchgeführt. Positive Transformanten wurden anschließend in SC-Galaktose-Medium, pH 7, Kaliumphosphatpuffer 4 d bei 165 rpm und 28 °C kultiviert. Der Überstand wurde 100fach konzentriert und im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 48 a). Der Western-Blot zeigte klare Banden bei ca. 80 kDa, welche dem prozessierten Kar2p entsprechen (Rose *et al.*, 1989). Die Coomassie-Färbung ergab jedoch nur sehr schwache Banden in diesem Größenbereich, was auf eine geringe Proteinmenge schließen lässt. Diese konnte auch durch Variation der Kultivierungsbedingungen nicht gesteigert werden.

Daher wurde die Expression in *P. pastoris* durchgeführt, wozu die *KAR2*-Varianten durch *BamHI/NotI*-Restriktion in den Vektor pPIC3.5 eingebracht wurden. Nach Linearisierung mit *SalI* erfolgte die Transformation durch Integration des Plasmids in das Genom von *P. pastoris* GS115 über den *his4*-Lokus. Zur Kontrolle der Integration wurde eine „Colony“-PCR durchgeführt und positive Transformanten in BMG Medium kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen in BMM-Medium (pH 7, Kaliumphosphatpuffer) überführt und 4 d bei 165 rpm und 28 °C inkubiert. Der Western-Blot des 100fach konzentrierten Kulturüberstands von verschiedenen Transformanten zeigte keine Banden im Bereich von 80 kDa, welche Kar2p entsprechen könnten, sondern lediglich bei zwei Transformanten niedermolekulare Signale von ca. 25 kDa (Abb. 49 b).

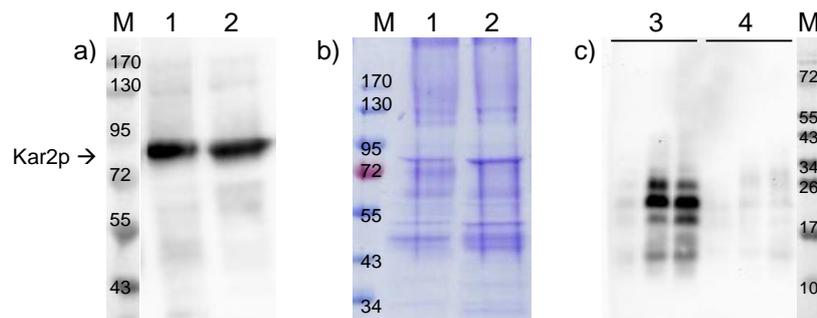


Abb. 49: Western-Analyse und Coomassie-Färbung von *K. lactis* und *P. pastoris* Kulturüberständen nach Sekretion von Kar2p-Varianten. **a)** und **b)** *K. lactis* wurde in SC-Galaktose-Medium, pH 7, Kaliumphosphatpuffer 4 d bei 165 rpm, 28 °C kultiviert und der 100fach konzentrierte Kulturüberstand im SDS-Gel aufgetrennt. **a)** Die Detektion im Western-Blot erfolgt durch anti-Kar2p Antikörper und HRP-gekoppelte anti-Kaninchen-Antikörper. **b)** Coomassie-Färbung. **c)** *P. pastoris* wurde in BMM-Medium, pH 7, Kaliumphosphatpuffer 4 d (165 rpm, 28 °C) induziert. Der 100fach konzentrierte Kulturüberstand wurde zur Western-Analyse wie unter Punkt a) beschrieben eingesetzt.

- (1) GG799 [pKLAC Kar2^{HDEL}]
- (2) GG799 [pKLAC Kar2^Δ]
- (3) GS115 [pPIC3.5 Kar2^{HDEL}]
- (4) GS115 [pPIC3.5 Kar2^Δ]
- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas)

Da die Expression von Kar2p in *P. pastoris* nicht zur Sekretion des korrekt prozessierten Proteins führte, wurden die Kar2p-Varianten in *E. coli* exprimiert. Corsi und Schekman (1997) konnten Kar2p mit N-terminalem 6 x His-Tag nach Expression in *E. coli* reinigen und die Aktivität des Proteins nachweisen. Kar2p besitzt ATPase-Aktivität, welche durch Messung der ATP-Hydrolyse bestimmt werden kann. Entsprechend dieser Vorschrift wurde KAR2 mit 6 x His-Tag, ohne N-terminales Sekretionssignal, beginnend bei Aminosäureposition 43 amplifiziert, so dass KAR2^{HDEL} ohne maskierenden Argininrest und KAR2^Δ erhalten wurden. Nach Klonierung dieser Varianten in den Vektor pET24a(+) über *NdeI/NotI* erfolgte die Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3). Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Kar2p-Varianten durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose aus dem Zellysate isoliert (Abb. 50).

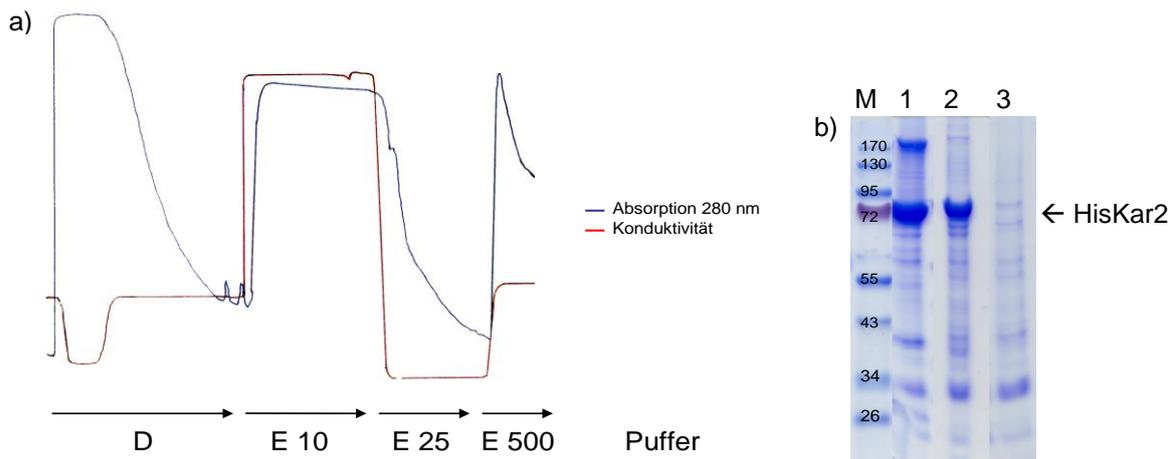


Abb. 50: Ergebnis der Expression von Kar2p-Varianten in *E. coli* und deren affinitätschromatographischer Reinigung. Die Kar2p-Expression und affinitätschromatographische Reinigung erfolgten nach einem Protokoll von Corsi und Schekman (1997). **a)** Schematischer Verlauf der Affinitätschromatographie von HisKar2^{HDEL} an Nickelsepharose. Angegeben sind die verwendeten Puffer, wobei Puffer D als Startpuffer und Puffer E 500 zur Proteinelution diente. **b)** SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der *E. coli*-Lysate nach affinitätschromatographischer Reinigung und Umpufferung in B88-Puffer.

- (1) BL21(DE3) [pET HisKar2^{HDEL}] Gesamtproteingehalt: 1,5 mg/ml
- (2) BL21(DE3) [pET HisKar2^A] Gesamtproteingehalt: 1,3 mg/ml
- (3) BL21(DE3) [pET] Gesamtproteingehalt: 0,7 mg/ml
- (M) Protein-Größenstandard „Page ruler prestained“ (Fermentas)

Der schematische Verlauf der Affinitätschromatographie zeigt die Elution von HisKar2^{HDEL} durch 500 mM Imidazol. Nach Umpufferung in B88-Puffer mittels Gelfiltrationschromatographie wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt und die Proteinlösung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Wie der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE zu entnehmen war, konnten HisKar2^{HDEL} sowie HisKar2^A nicht vollständig gereinigt werden; dennoch war jeweils eine starke Bande bei ca. 70 kDa zu erkennen, welche dem berechneten Molekulargewicht der heterolog exprimierten Proteine entsprach und in der Negativkontrolle nicht zu detektieren war.

Um eine Aussage über die biologische Aktivität von Kar2p treffen zu können, sollte die ATPase-Aktivität der Enzyme bestimmt werden. Dazu wurde die freigesetzte Menge an Orthophosphat kolorimetrisch gemessen; die Empfindlichkeit dieses Nachweises liegt im nmol-Bereich (Steel *et al.*, 2004; Turgay *et al.*, 1997; Lanzetta *et al.*, 1979). Allerdings enthielt bereits die Vektorkontrolle, *E. coli* BL21(DE3) [pET]-Lysat, welches analog zu den Kar2-Präparationen behandelt worden war, eine mit HisKar2^{HDEL} vergleichbare Menge an Orthophosphat (Abb. 51). Daher konnten die Ergebnisse dieses Tests nicht zu einem Vergleich der Enzymaktivität von HisKar2^{HDEL} und HisKar2^A herangezogen werden.

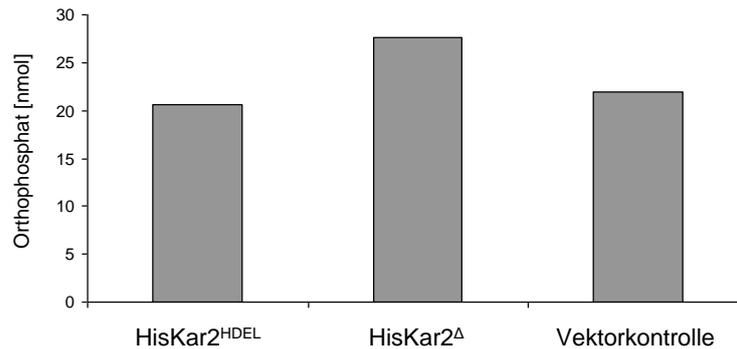


Abb. 51: ATPase-Aktivität von HisKar2^{HDEL} und HisKar2^Δ. Die freigesetzte Menge an Orthophosphat wurde als Maß für die ATPase-Aktivität von Kar2^{HDEL}, Kar2^Δ und analog behandeltem [pET]-Lysat (Vektorkontrolle) nach Steel *et al.* (2003) und Lanzetta *et al.* (1979) bestimmt (Gesamtproteinkonzentration: 1000 µg/ml). Nach 30 min Inkubation der Protein-Lösung mit Reaktionspuffer wurde Lanzetta-Lösung zugegeben und die Absorption bei 655 nm gemessen. Zum Vergleich wurde eine Dikaliumhydrogenphosphat-Eichreihe mitgeführt

Inkubation von Sphäroplasten mit Kar2p-Varianten

Die heterolog in *E. coli* exprimierten und gereinigten Kar2p-Varianten wurden zu Inkubationsexperimenten mit Hefesphäroplasten eingesetzt. Die Sphäroplastierung wurde durchgeführt, da die Zellwand die Aufnahme des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa behindern könnte. Um die Kar2p-Aufnahme quantifizieren zu können, wurde der temperatursensitive *kar2^{ts}* Stamm RSY475 (*kar2-159*) verwendet. Dieser besitzt eine Mutation in der ATPase-Domäne, so dass es bei der restriktiven Temperatur von 37 °C zu einem schnellen Wachstumsstopp und einem Verlust der Lebensfähigkeit kommt (Vogel *et al.*, 1990). Durch Erd2p vermittelte Internalisierung und retrograden Transport von extern appliziertem Kar2p sollte wildtypisches Kar2p das ER erreichen und dort die essentielle Funktion des Chaperons ausüben (Abb. 52).

Die Respirationssmessung wurde in Oxoplates durchgeführt, welche eine Überwachung der Zellvitalität ermöglichen. Diese Mikrotiterplatten besitzen auf dem Boden jedes Wells einen immobilisierten Sauerstoffsensoren, der zwei unterschiedliche Fluorophore, Sensor und Referenz, beinhaltet. Die Fluoreszenzintensität des Sensors korreliert mit der Konzentration an gelöstem Sauerstoff, was als Maß für den Sauerstoffverbrauch der Zellen und damit deren Vitalität herangezogen werden kann (John *et al.*, 2003). Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen sphäroplastiert und mit den Kar2p-Varianten oder der entsprechenden Pufferkontrolle in Oxoplates 16 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C in einem Fluoreszenzreader inkubiert.

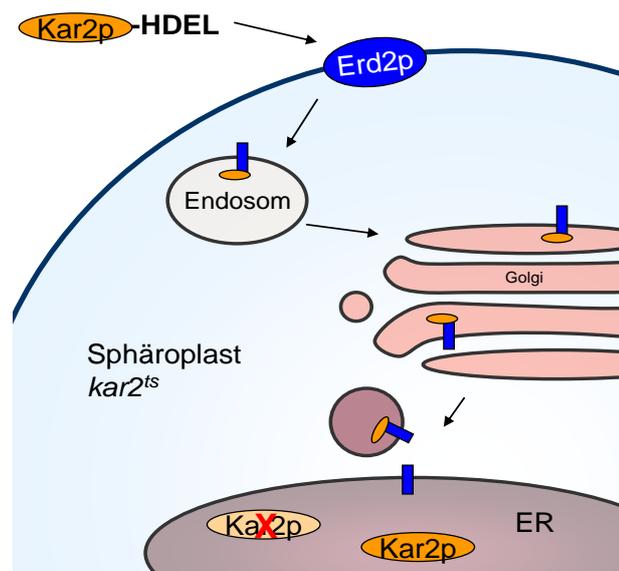


Abb. 52: Schema der Erd2p-vermittelten Kar2^{HDEL}-Internalisierung durch *S. cerevisiae* kar2^{ts} Sphäroplasten. Das essentielle luminaire ER-Chaperon Kar2p wurde heterolog exprimiert, gereinigt und mit temperatursensitiven kar2^{ts} Sphäroplasten inkubiert. Sein C-terminales HDEL-Signal ermöglicht die Interaktion mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p, der in geringer Kopienzahl an der Plasmamembran kolokalisiert. Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose erreicht der Erd2p/Kar2p-Rezeptor/Liganden-Komplex durch retrograden Transport entlang des Sekretionswegs das ER. Dort kann internalisiertes Kar2p die Funktion der bei restriktiver Temperatur mutierten endogenen Kar2p-Variante übernehmen und das Überleben der Zelle sicherstellen.

Wie Abb. 53 zeigt, blieb der Sauerstoffpartialdruck während der Kultivierung von wildtypischen *KAR2*-Sphäroplasten auf sehr niedrigem Niveau, wohingegen er bei Inkubation von kar2^{ts} mit der Pufferkontrolle bis auf ca. 65 % anstieg. Diese Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks ist auf einen verminderten Sauerstoffverbrauch und damit auf einen Verlust der Zellvitalität bei restriktiver Temperatur zurückzuführen, womit der Wachstumsdefekt der temperatursensitiven kar2^{ts}-Mutante bei restriktiver Temperatur auch unter den gewählten Versuchsbedingungen bestätigt werden konnte.

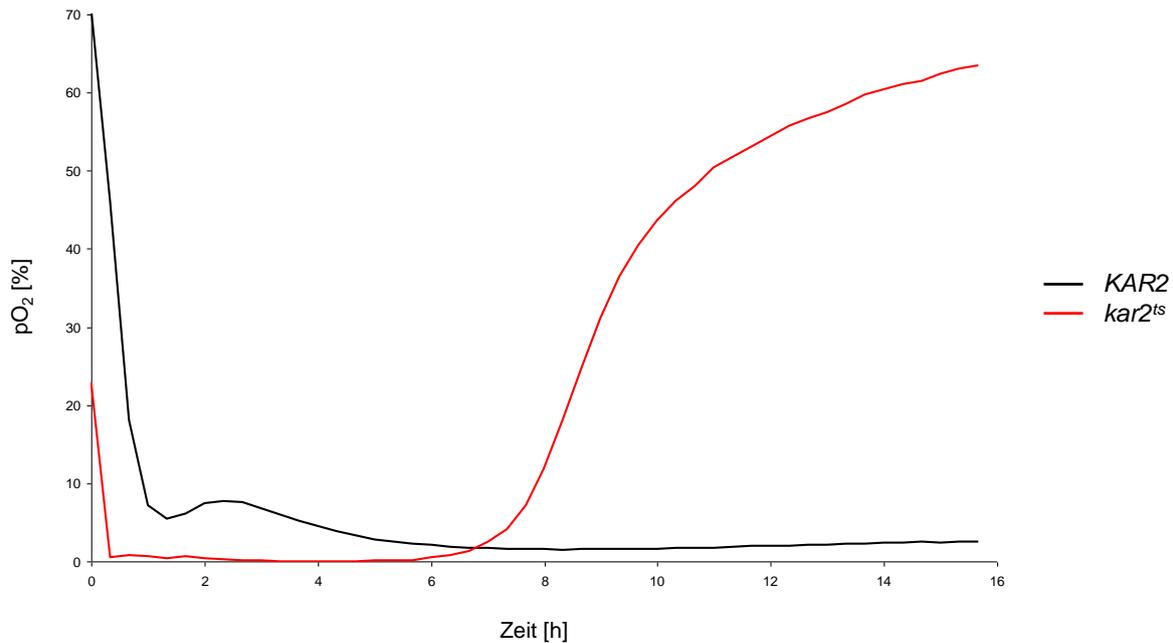


Abb. 53: Sauerstoffverbrauch von *S. cerevisiae* KAR2 und *kar2^{ts}* bei restriktiver Temperatur. RSY475 (*kar2^{ts}*) und rsy255 (KAR2) wurden sphäroplastiert, in Inkubationspuffer aufgenommen und mit B88-Puffer (0,8 M Sorbitol, 10 % Glycerin) versetzt. Die Sauerstoffkonzentration als Prozentsatz der Luftsättigung wurde in Oxoplates ($1,8 \times 10^7$ Zellen/Well) über einen Zeitraum von 16 h bei 37 °C und 120 rpm in einem Fluoreszenzreader (Fluoroskan Ascent, Labsystems) nach John *et al.* (2003) bestimmt.

Als Kontrollen wurden *E. coli* BL21(DE3) [pET]-Lysat, welches analog zu den Kar2-Präparationen behandelt worden war, sowie BSA in verschiedenen Konzentrationen mitgeführt. Beide hatten keinen Einfluss auf die Zellvitalität (Abb. 54 a und b): Der Sauerstoffpartialdruck stieg bei Inkubation von *kar2^{ts}*-Sphäroplasten bei restriktiver Temperatur nach 6 h bis auf ca. 65 % an, wobei auch durch Variation der Proteinkonzentration (maximal 75 µg pro Well) kein positiver Effekt auf die Zellvitalität erzielt werden konnte. Die Negativkontrollen scheinen folglich keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen zu haben. Im Gegensatz dazu zeigten *kar2^{ts}*-Sphäroplasten bei Inkubation mit HisKar^{HDEL} mit zunehmender Konzentration eine Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes (Abb. 54 c). HisKar2^{HDEL} scheint daher aufgenommen und retrograd bis in das ER transportiert worden zu sein, wo es die Funktion des endogenen mutierten Kar2p übernehmen und damit die Zellvitalität erhöhen kann. Allerdings ergab die Inkubation mit HisKar2^Δ ebenfalls Dosis-abhängig einen positiven Effekt (Abb. 54 d): Mit steigender HisKar2^Δ-Konzentration nahm der Sauerstoffpartialdruck ab, was darauf hindeutet, dass auch Kar2p ohne C-terminales HDEL-Signal die Zellvitalität positiv beeinflussen kann.

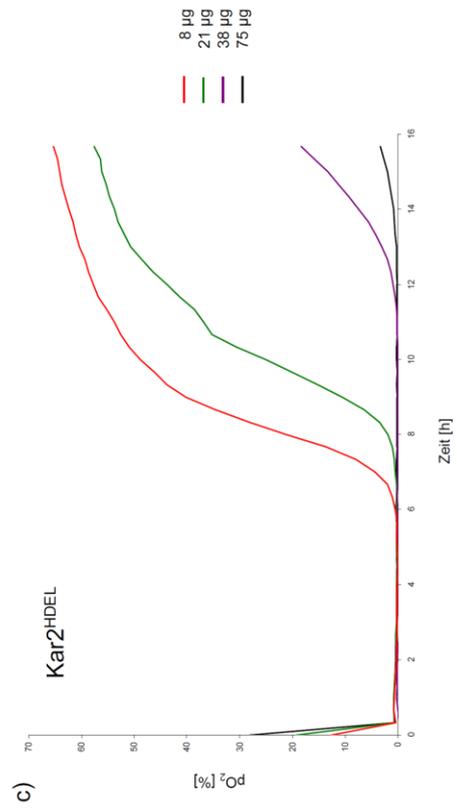
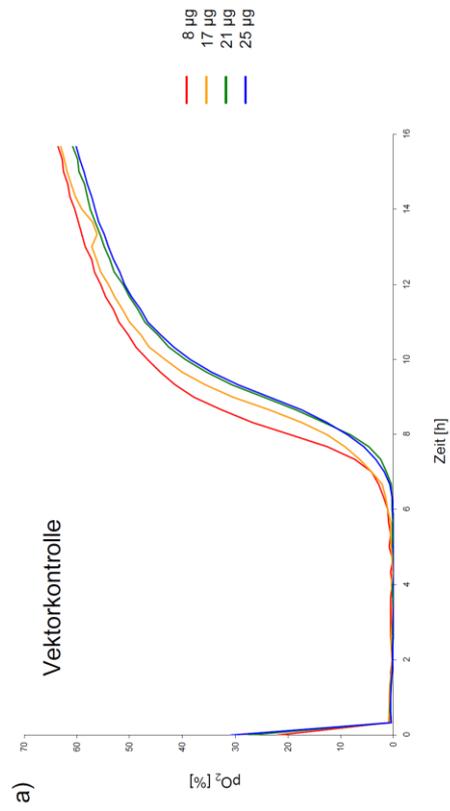
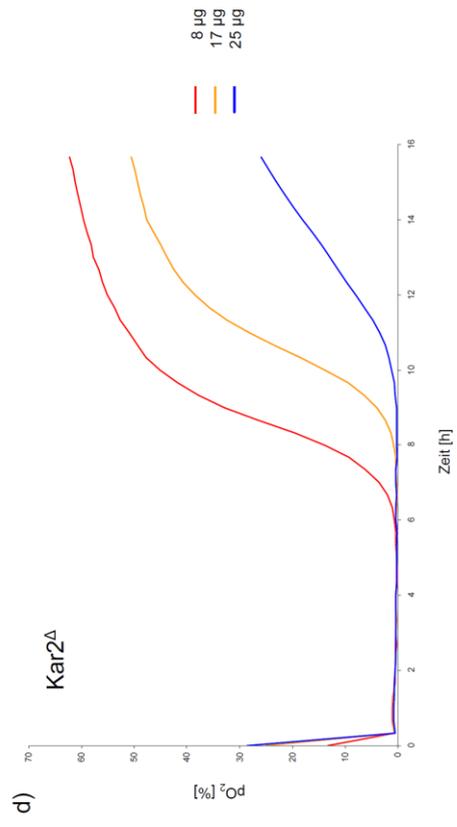
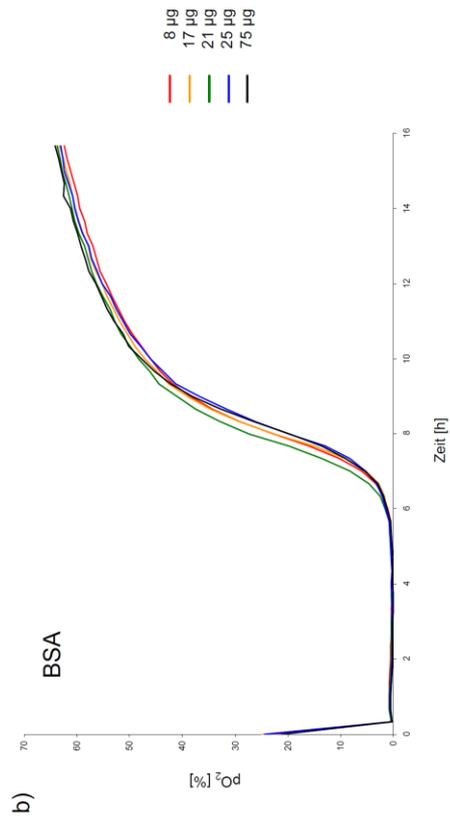


Abb. 54: Einfluss von HisKar2^{HDEL} auf den Sauerstoffverbrauch von *S. cerevisiae kar2^{ts}* bei restriktiver Temperatur. RSY475 (*kar2^{ts}*) wurde sphäroplastierte, in Inkubationspuffer aufgenommen und mit [pET]-Lysat als Vektorkontrolle (a), BSA (b), HisKar2^{HDEL} (c) oder HisKar2^Δ (d)-Präparationen in verschiedenen Verdünnungen in B88-Puffer (0,8 M Sorbitol, 10 % Glycerin) versetzt. Die Gesamtproteinmenge betrug unverdünnt 75 µg/Well. Die Sauerstoffkonzentration als Prozentsatz der Luftsättigung wurde in Oxoplates (1,8 x 10⁷ Zellen/Well) über einen Zeitraum von 16 h bei 37 °C und 120 rpm in einem Fluoreszenzreader (Fluoroskan Ascent, Labsystems) nach John *et al.* (2003) bestimmt.

Die Respirationsmessung wurde mit mehreren HisKar2^{HDEL} und HisKar2^Δ-Präparationen wiederholt, wobei die dargestellten Ergebnisse bestätigt werden konnten. Da sowohl HisKar2^{HDEL} als auch die Kar2p-Variante ohne C-terminales HDEL-Signal einen positiven Effekt auf die Zellvitalität von *kar2^{ts}* Sphäroplasten zeigten, besteht die Möglichkeit, dass die Aufnahme und der retrograde Transport des Proteins nicht exklusiv über den HDEL-Rezeptor Erd2p vermittelt werden. Da das verwendete Testsystem auf einer temperatursensitiven *kar2^{ts}*-Mutante beruht, konnte der Effekt einer Deletion des HDEL-Rezeptors *ERD2* oder weiterer an der Endozytose und dem retrograden Transport beteiligter Komponenten durch Einsatz der entsprechenden Deletionsmutanten nicht analysiert werden. Um dennoch die Aufnahme einer Kar2p-Variante ohne C-terminales HDEL-Signal zu untersuchen, wurde der retrograde Transport durch den Einsatz von Brefeldin A (BFA) blockiert. Dies inhibiert Aktivoren von ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs), wodurch es zu einem Zerfall der COP I-beschichteten Vesikel und schließlich des Golgi-Apparates kommt (Chardin & McCormick, 1999). In Hefezellen wurde eine Wirkung von BFA in sehr hohen Konzentrationen, bei Mutanten mit einer erhöhten Membranpermeabilität wie *Δerg6* oder Sphäroplasten beschrieben (Bandlow *et al.*, 1995). Die Zugabe von bis zu 0,4 mM BFA, gelöst in Ethanol oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle zu wildtypischen Sphäroplasten (*rsy255*) hatte keinen negativen Effekt auf deren Vitalität (Abb. 55 a). Die Inkubation von *kar2^{ts}* mit Kar2p-Varianten und 0,4 mM BFA oder der entsprechenden Menge Ethanol als Kontrolle führte jeweils zu einem Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks und damit zu einer verminderten Vitalität (Abb. 55 b). Der positive Effekt von HisKar2^{HDEL} oder HisKar2^Δ wurde bereits durch die Zugabe der Lösungsmittelkontrolle Ethanol stark verringert, was auf einen Aktivitätsverlust von Kar2p durch das Lösungsmittel zurückgeführt werden kann. Daher konnte unter diesen Bedingungen der Einfluss von BFA auf die Kar2^Δ-Internalisierung nicht bestimmt werden. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse keinen Rückschluss auf eine Erd2p-vermittelte Internalisierung eines natürlichen HDEL-tragenden Liganden zu. Zwar konnte eine positive Wirkung von extern appliziertem Kar2^{HDEL} auf *kar2^{ts}*-Sphäroplasten nachgewiesen werden, allerdings scheint dieser retrograde Transport entweder nicht exklusiv durch den HDEL-Rezeptor oder durch ein alternatives, HDEL-ähnliches intramolekulares ER-Retentions-signal in Kar2p (KFEL an Position 501) vermittelt zu werden, da auch Kar2^Δ das ER zu erreichen scheint.

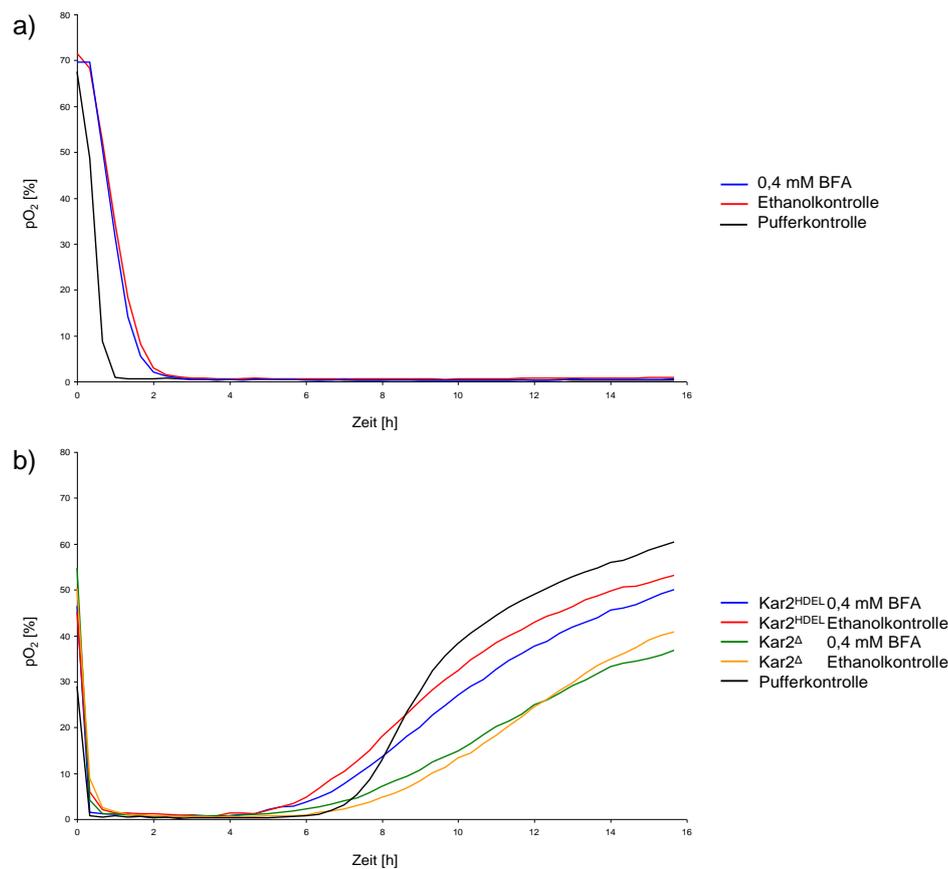


Abb. 55: Einfluss von Brefeldin A auf den Sauerstoffverbrauch von *S. cerevisiae kar2^{ts}* nach Inkubation mit Kar2p-Varianten. Der Wildtyp rsy255 (a) oder deren Mutante RSY475 (*kar2^{ts}*) (b) wurden sphäroplastiert, in Inkubationspuffer aufgenommen und mit 0,4 mM Brefeldin A (BFA) in Ethanol, einem Volumenäquivalent Ethanol (Ethanolkontrolle) und HisKar2^{HDEL}, HisKar2^Δ (40 µg/Well) oder der Pufferkontrolle (B88-Puffer 0,8 M Sorbitol, 10 % Glycerin) versetzt. Die Sauerstoffkonzentration als Prozentsatz der Luftsättigung wurde in Oxoplates (1,8 x 10⁷ Zellen/Well) über einen Zeitraum von 16 h bei 37 °C und 120 rpm in einem Fluoreszenzreader (Fluoroskan Ascent, Labsystems) nach John *et al.* (2003) bestimmt.

3.4. Untersuchungen zur endozytotischen K28-Aufnahme und zum intrazellulären Toxintransport durch den HDEL-Rezeptor Erd2p

Wie im vorherigen Kapitel (Punkt 3.3) gezeigt werden konnte, ist der HDEL-Rezeptor Erd2p in geringer Kopienzahl auch in der Plasmamembran und in endosomalen Kompartimenten vorhanden. Erste Hinweise, dass K28 durch Endozytose in die Zelle gelangt, ergab die Bestimmung der K28-Sensitivität von Deletionsmutanten mit Defekten in der Endozytose, welche Toxinresistenz aufwiesen (Eisfeld *et al.*, 2000). Des Weiteren wurden durch Mutagenese Motive im HDEL-Rezeptor Erd2p lokalisiert, welche einen Einfluss auf die Rezeptorendozytose und damit die Toxinaufnahme haben (Dausend, 2010).

Im Folgenden sollte der Mechanismus der Erd2p-Endozytose und des retrograden Transportes näher charakterisiert werden. Neben der Identifikation und Analyse weiterer an der K28-Endozytose beteiligter Proteine sollte die Untersuchung der Erd2p Endozytose, auch im Hinblick auf die Rezeptormobilität, zur Aufklärung der Aufnahme und des retrograden Transports des Rezeptor-Liganden-Komplexes beitragen.

3.4.1. Screening von Mutanten mit Defekten in der Endozytose und dem retrograden Transport

Zur Identifizierung von Proteinen, welche in der K28-Aufnahme und dem retrograden Toxintransport involviert sind, wurden entsprechende Deletionsmutanten auf ihre K28-Sensitivität im Vergleich zum isogenen Wildtyp untersucht. Diese Vorgehensweise ermöglicht die schnelle Untersuchung einer großen Anzahl an Deletionsmutanten, welche kommerziell erhältlich sind (Invitrogen). Ein erster Screen von Deletionsmutanten konnte 2005 bereits einen guten Einblick in die endozytische Aufnahme und den intrazellulären Transport von K28 liefern (Heiligenstein, 2008). Ergänzend dazu wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Hefestämme untersucht, die Deletionen von Genen aufweisen, deren Produkte eine Funktion innerhalb der Endozytose und des retrograden intrazellulären Transports zukommt. Deletionsmutanten, welche bereits von Heiligenstein (2008) oder Carroll *et al.* (2009) untersucht wurden, wurden an dieser Stelle nicht berücksichtigt.

Zur Bestimmung der K28-Sensitivität wurden 1×10^6 Zellen der zu untersuchenden Deletionsmutante bzw. des isogenen Wildtyps BY4742 in Minimal-Methylenblau-Glukose-Agar eingebettet und nach Zugabe von 100 μ l K28-Toxinkonzentrat und einer Inkubation von 3 d bei 20 °C die Hemmhofgröße bestimmt. Ab einem Unterschied im Hemmhofdurchmesser von mehr als 2 mm zwischen Wildtyp und Deletionsmutanten wurde ein Phänotyp angenommen. Das Ergebnis des Screens ist in Tab. 18 dargestellt. Diese ist in die Aspekte Endozytose, Aktinpolymerisation zur Endozytose, Transport zu Golgi/Vakuole und Ubiquitinierung während der Endozytose unterteilt.

Ein Großteil der Deletionen hatte keinen Einfluss auf die K28-Sensitivität, was unter anderem auf Redundanzen zwischen den Proteinen zurückzuführen ist. Eine Redundanz zwischen den Adaptoren zur Ubiquitinierung, wie Art10p oder Bul1p und Bul2p, wurde beispielsweise bereits für die Internalisierung der Uracil-Permease Fur4p beschrieben (Nikko & Pelham, 2009).

Einen deutlichen Phänotyp verursachte die Deletion von *ERG6*, kodierend für ein Enzym der Ergosterol-Biosynthese. Δ *erg6* zeigte eine deutlich erhöhte K28-Sensitivität, was auf eine erhöhte Plasmamembranpermeabilität oder einen verringerten vakuolären Transport zurückzuführen sein könnte; beide Defekte wurden für Δ *erg6*-Mutanten beschrieben (Parks *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1993; Hoffman & Chiang, 1996).

Den stärksten Phänotyp zeigte Δ *ldb17* mit einer vollständigen Toxinresistenz. Ldb17p (Low dye binding) reguliert Cargo-unabhängig die Aktin-Assemblierung während der Endozytose, vermutlich durch die Verbindung von Sla1p mit dem Arp2/3-Komplex (Burston *et al.*, 2009). Sla1p ist ein Bestandteil des Pan1-Komplexes, der verantwortlich ist für die Verbindung von Cargo-Molekülen mit dem Clathrin- bzw. Aktin-Gerüst; der Arp2/3-Komplex stimuliert die Aktinpolymerisation.

Eine deutliche Hypersensitivität wurde durch die Deletion von *PEP12*, einem t-SNARE, hervorgerufen. Pep12p ist am Vesikeltransport zwischen Endosomen, Golgi und Vakuole beteiligt. Durch die Deletion wird z. B. die Aminosäure-Permease Gap1p nach Internalisierung nicht mehr bis zur Vakuole transportiert (Nikko & André, 2007).

Alle weiteren getesteten Deletionsmutanten zeigten keine veränderte K28-Sensitivität. Wie bereits beschrieben, können Phänotypen durch das Vorhandensein homologer Proteine überdeckt werden. Heiligenstein (2008) untersuchte bereits den Einfluss der Einzeldelationen von *YAP1801* und *YAP1802*, jedoch wurde keine veränderte K28-Sensitivität festgestellt. Beide Gene kodieren Proteine, welche an der Clathrin-Assemblierung beteiligt sind und mit dem Pan1-Komplex interagieren (Wendland & Emr, 1998). *YAP1802* weist eine 43%ige Sequenzübereinstimmung zu seinem Homolog *YAP1801* auf. Wie für die Endozytose des Vesikel-assoziierten Membranproteins Snc1p gezeigt wurde, führte erst der Ausfall beider Genprodukte in einer *yap1801yap1802* Doppelmutante zu einer stark reduzierten Snc1p-Endozytose. Dieser Effekt scheint jedoch Cargo-spezifisch zu sein, da unter anderem die ligandeninduzierte Internalisierung des α -Faktor/Ste2p-Komplexes in einem Δ *yap1801\Delta**yap1802* Stammhintergrund nicht verändert war (Huang *et al.*, 1999; Burston *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Zweifachdeletion von *YAP1801* und *YAP1802* auf die K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* untersucht: Der Stamm MDY581 (Δ *yap1801\Delta**yap1802*) zeigte im Vergleich zum isogenen Wildtyp BY4741 keine veränderte K28-Sensitivität. Insgesamt konnten in dieser Arbeit durch ein Screening von Deletionsmutanten die Genprodukte von *ERG6*, *LDB17* und *PEP12* als an der K28-Aufnahme bzw. dem retrograden Toxintransport beteiligte Komponenten identifiziert werden.

Tab. 18: Screening von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten mit Defekten in der Endozytose oder dem intrazellulären Transport: Bestimmung der K28-Sensitivität. 1×10^6 Zellen wurden in Minimal-Methylenblau-Gukose-Agar eingebettet, 100 μ l K28-Toxinkonzentrat (200fach) in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 d Inkubation bei 20 °C bestimmt. Aufgeführt sind die Funktion des Genproduktes, die entsprechende Referenz und die K28-Sensitivität: (+) wildtypisch, (++) hypersensitiv, (-) vermindert sensitiv, (--) resistent. Der Hemmhofdurchmesser des Wildtyps BY4742 betrug 13 mm. Stämme mit signifikant verändertem K28-Phänotyp sind im Fettdruck dargestellt.

Deletiertes Gen	ORF	Funktion des Genproduktes	Referenz	K28-Sensitivität (Hemmhof Ø)
<i>AIM21</i>	YIR003W	beteiligt an der Endozytose	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>ERG6</i>	YML008C	Delta(24)-sterol C-methyltransferase, Ergosterol-Biosynthese	Kishimoto <i>et al.</i>, 2005	++ (17 mm)
<i>INP52</i>	YNL106C	Polyphosphatidylinositol-Phosphatase, beteiligt an der Endozytose	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>NCE102</i>	YPR149W	Integrales Membranprotein der MCC ("membrane compartment of Can1p")	Grossmann <i>et al.</i> , 2008	+
<i>PIL1</i>	YGR086C	Hauptbestandteil der Eisosomen	Walther <i>et al.</i> , 2006	+
<i>SEE1</i>	YIL064W	eEF1A (euk. Elongationsfactor 1A) Methyltransferase/Endozytose	Martin-Granados <i>et al.</i> , 2008; Lipson <i>et al.</i> , 2010	+
<i>SYP1</i>	YCR030C	Septin-assoziiertes Protein, beteiligt an der Clathrin-vermittelten Endozytose, Adaptor-Funktion	Reider <i>et al.</i> , 2009 Stimpson <i>et al.</i> , 2009	+
<i>GTS1</i>	YGP181W	Putatives Arf GTPase-aktivierendes Protein, Abbau des Pan1-Komplexes	Toret <i>et al.</i> , 2008	+
<i>LSB5</i>	YCL034W	Arf GTPase interagierendes Protein, Abbau des Pan1-Komplexes	Toret <i>et al.</i> , 2008	+
Aktinpolymerisation				
<i>AIP1</i>	YMR092C	Komponente kortikaler Aktin-Patches, Cofilin-Lokalisation	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>BBC1</i>	YJL020C	Assemblierung von kortikalen Aktin-Patches	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>BZZ1</i>	YHR114W	Regulation der Aktinpolymerisation	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>CAP1</i>	YKL007W	α -Untereinheit des „capping“-Protein-Heterodimers, Bindung an Aktinfilamente verhindert weitere Polymerisation	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>CAP2</i>	YIL024C	β -Untereinheit des „capping“-Protein-Heterodimers, Bindung an Aktinfilamente verhindert weitere Polymerisation	Burston <i>et al.</i> , 2009	+

Deletiertes Gen	ORF	Funktion des Genproduktes	Referenz	K28-Sensitivität (Hemmhof Ø)
<i>CRN1</i>	YLR419W	Coronin, Regulation des Arp2/3-Komplexes, Aktin-Patch-Assemblierung	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>LDB17</i>	YDL146W	dynamische Regulation der Aktinpolymerisation während der Endozytose	Burston <i>et al.</i>, 2009	-- (0 mm)
<i>LSB3</i>	YFR024C	Regulation der Aktin-Patch-Assemblierung und Aktinpolymerisation	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>PRK1</i>	YIL095W	Serin/Threonin Kinase, Regulation der Endozytose-Maschinerie und des Aktinzytoskeletts	Smythe & Ayscough, 2003	+
<i>ARK1</i>	YNL020C	Serin/Threonin Kinase, Regulation der Endozytose-Maschinerie und des Aktinzytoskeletts	Smythe & Ayscough, 2003	+
<i>TWF1</i>	YGR080W	Twinfilin, Regulation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts	Burston <i>et al.</i> , 2009	+
<i>YSC84</i>	YHR016C	Aktin-bindendes Protein, Bündeln von Aktinfilamenten, Endozytose	Robertson <i>et al.</i> , 2009	+
Transport Golgi/Vakuole				
Deletiertes Gen	ORF	Funktion des Genproduktes	Referenz	K28-Sensitivität
<i>PEP12</i>	YOR036W	Target membrane receptor (t-SNARE): Vesikeltransport zwischen Golgi und Vakuole	Becherer <i>et al.</i>, 1996 Nikko & André, 2007	++ (18 mm)
<i>SNX3</i>	YOR357C	Nexin, Lokalisation von Golgi-residenten Protein durch Rücktransport aus dem prävakuolären Kompartiment	Strochlic <i>et al.</i> , 2007	+
<i>SNX4</i>	YJL036W	Nexin, Proteintransport aus post-Golgi-Endosomen zum <i>trans</i> -Golgi Netzwerk	Hettema <i>et al.</i> , 2003	+
<i>SNX41</i>	YDR425W	Nexin, Proteintransport aus post-Golgi Endosomen zum <i>trans</i> -Golgi Netzwerk	Hettema <i>et al.</i> , 2003	+
<i>SNX42</i>	YDL113C	Nexin, Proteintransport aus post-Golgi Endosomen zum <i>trans</i> -Golgi Netzwerk	Hettema <i>et al.</i> , 2003	+
<i>VPS21</i>	YOR089C	Rab-GTPase, Interaktion mit CORVET-Komplex, Endozytose	Markgraf <i>et al.</i> , 2009	+
<i>VPS3</i>	YDR495C	Bestandteil des CORVET („class C core vacuole/endosome tethering“-Komplexes, Sortierung löslicher vakuolärer Proteine	Markgraf <i>et al.</i> , 2009	+

Deletiertes Gen	ORF	Funktion des Genproduktes	Referenz	K28-Sensitivität (Hemmhof Ø)
<i>VPS4</i>	YDR173C	AAA-ATPase, MVB („multivesicular body“) -Protein-Sortierung	Babst <i>et al.</i> , 1998	+
<i>VPS8</i>	YAL002W	Bestandteil des CORVET-Komplexes, Sortierung löslicher vakuolärer Proteine	Markgraf <i>et al.</i> , 2009	+
<i>VPS9</i>	YML097C	Vps21p -GEF (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor), vakuolärer Transport	Markgraf <i>et al.</i> , 2009	+
<i>YPT6</i>	YLR262C	GTPase, Fusion von endosomalen Vesikeln mit dem späten Golgi	Krsmanovic <i>et al.</i> , 2005	+
Ubiquitinierung				
<i>ART10</i>	YLR392C	Arrestin-ähnlicher Adaptor zur Ubiquitinierung und Endozytose	Nikko & Pelham, 2009	+
<i>BRO1</i>	YPL084W	„vacuolar protein sorting“ (VPS)-Faktor, Koordination der Deubiquitinierung durch Rekrutierung von Doa4p zum Endosom	Nikko & André, 2007	+
<i>BSD2</i>	YBR290W	Adaptor zur Ubiquitinierung, Membranprotein	Nikko & Pelham, 2009	+
<i>BUL1</i>	YMR275C	Adaptor zur Ubiquitinierung	Nikko & Pelham, 2009 Liu <i>et al.</i> , 2007	+
<i>BUL2</i>	YML111W	Adaptor zur Ubiquitinierung	Nikko & Pelham, 2009 Liu <i>et al.</i> , 2007	+
<i>EAR1</i>	YMR171C	Adaptor zur Ubiquitinierung, Membranprotein	Nikko & Pelham, 2009	+
<i>PIB1</i>	YDR313C	Ubiquitin-Ligase an endosomalen und vakuolären Membranen	Nikko & Pelham, 2009	+
<i>RCR1</i>	YBR005W	Adaptor zur Ubiquitinierung, Membranprotein	Nikko & Pelham, 2009	+
<i>UBP2</i>	YOR124C	Ubiquitin-spezifische Protease, Interaktion mit Rsp5p	Burston <i>et al.</i> , 2009	+

3.4.2. Untersuchungen zur Endozytose von K28/Erd2p: „PURE-Pathway“

Der exakte Mechanismus der Internalisierung des HDEL-Rezeptors Erd2p wurde noch nicht aufgeklärt. Die Internalisierung des Pheromonrezeptors Ste2p und weiterer Membranproteine folgt einem allgemeinen Schema, bestehend aus Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Erkennung des Rezeptors und schließlich dessen Endozytose (Kelm *et al.*, 2004). Erste Hinweise zur Internalisierung des HDEL-Rezeptors deuten ebenfalls auf einen mehrstufigen Prozess hin (Dausend, 2010). In der vorliegenden Arbeit sollten durch weiterführende Experimente die bisherigen Ergebnisse bestätigt und die Analysen ausgeweitet werden.

3.4.2.1. Phosphorylierung von Erd2p: Einfluss der Proteinkinasen Yck1p/Yck2p auf die K28-Sensitivität

Den ersten Schritt des „PURE-Pathway“ stellt die Phosphorylierung des zu internalisierenden Proteins dar. Zahlreiche Membranproteine wie Fur4p, Pho84p, Ste2p und Ste3p werden zunächst phosphoryliert, bevor die nachfolgende Ubiquitinierung stattfinden kann. Die Phosphorylierung scheint daher als positiver Regulator für die Ubiquitinierung zu fungieren. Der HDEL-Rezeptor Erd2p besitzt am C-Terminus ein potentielles Phosphorylierungssignal: Der Austausch der Aminosäure Threonin 207 oder deren Deletion verringerte die K28-Sensitivität, eine vollständige Toxinresistenz wurde nicht festgestellt (Dausend, 2010). Die Phosphorylierung am C-Terminus von Erd2p scheint demnach kein essentieller Schritt der K28/Erd2p-Internalisierung darzustellen. Neben der Untersuchung weiterer potentieller Phosphorylierungsstellen, welche nicht im C-Terminus von Erd2p lokalisiert sind, wäre die Identifikation der Proteinkinase ein wichtiger Schritt zum Nachweis einer Phosphorylierung des HDEL-Rezeptors. Die Phosphorylierung der Membranproteine Ste2p, Ste3p, Fur4p und Jen1p wird durch die Ser/Thr-spezifischen Protein-Kinasen Yck1p und Yck2p vermittelt (Toshima *et al.*, 2009; Panek *et al.*, 1997; Marchal *et al.*, 2000; Paiva *et al.*, 2009). Die Einzeldelationen dieser Kinasen führten zwar nicht zu einer veränderten K28-Sensitivität (Heiligenstein, 2008), allerdings sind beide Kinasen funktionell homolog, so dass beim Ausfall von nur einer Kinase eine unveränderte Toxinsensitivität erklärbar wäre. Da die Deletion von *YCK1* und *YCK2* zur Letalität führt, sollte im Folgenden eine temperatursensitive Doppelmutante getestet werden. Der Agardiffusionstest zur Bestimmung der K28-Sensitivität wurde bei 30 °C (permissive Temperatur) und bei 34 °C (semi-restriktive Temperatur) durchgeführt, da bei der restriktiven Temperatur von 37 °C kein Zellwachstum mehr stattfindet (Panek *et al.*, 1997). Als Kontrolle wurde das Toxin K1 mitgeführt, ebenfalls ein virales Killertoxin, dessen Rezeptoren und Wirkungsmechanismus sich grundlegend von K28 unterscheiden. Damit sollte eine eventuelle erhöhte Sensitivität

der Zellen aufgrund von bereits auftretenden Wachstumsdefekten oder der erhöhten Temperatur detektiert werden. Wie Abb. 56 zu entnehmen ist, führte der Ausfall beider Kinasen zu einer erhöhten K28-Sensitivität. Im Vergleich dazu blieb die K1-Sensitivität bei restriktiver Temperatur unverändert. Die unerwartete Hypersensitivität der *yck1Δyck2-2^{ts}*-Mutante könnte auf Sekundäreffekte zurückzuführen sein, da die Kinasen Yck1p/Yck2p in weitere zelluläre Prozessen involviert sind, wobei die mögliche fehlende Phosphorylierung des HDEL-Rezeptors Erd2p nur eine untergeordnete Auswirkung haben könnte (Robinson *et al.*, 1993). Folglich konnte die Bestimmung der K28-Sensitivität der Kinase-Mutante *yck1Δyck2-2^{ts}* nicht zur Aufklärung einer potentiellen Erd2p-Phosphorylierung beitragen.

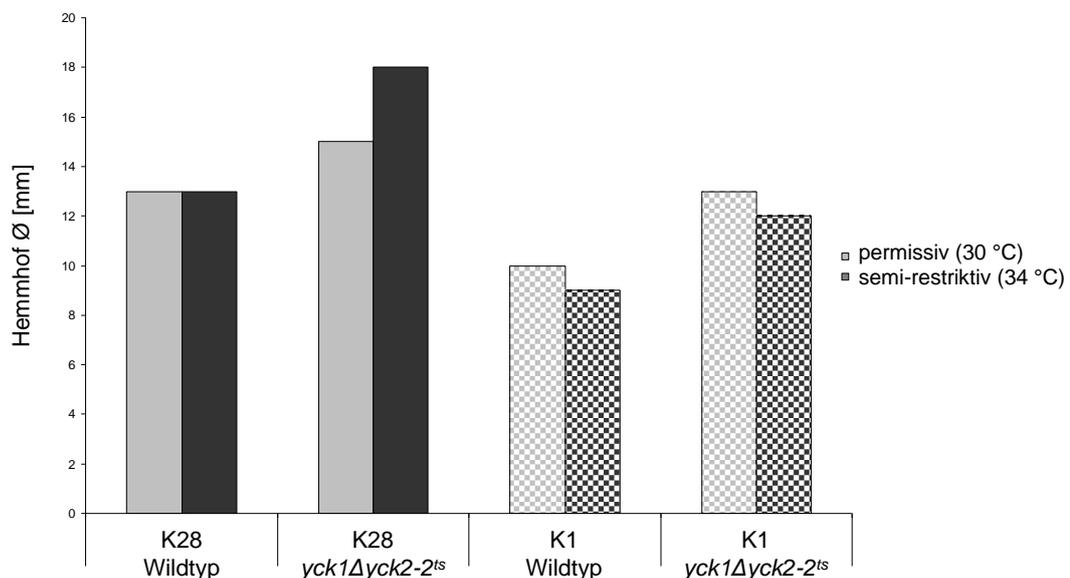


Abb. 56: K28- und K1-Sensitivität einer temperatursensitiven *S. cerevisiae* *yck1Δyck2-2^{ts}* Mutante. 1×10^6 Zellen wurden in Minimal-Methylenblau-Gukose-Agar eingebettet, 100 μ l K28- oder K1-Toxinkonzentrat in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 d Inkubation bestimmt. WT: LRB759; *yck1Δyck2-2^{ts}*: LRB951.

3.4.2.2. Ubiquitinierung von Erd2p: Bedeutung des Lysinclusters im C-Terminus

Der zweite Schritt des „PURE-Pathway“ beinhaltet die Ubiquitinierung des zu internalisierenden Proteins. Dies ermöglicht die Erkennung durch die Endozytose-Maschinerie, gefolgt von der Internalisierung des Membranproteins. Die Ubiquitinierung wurde bei einer Vielzahl von Plasmamembranproteinen nachgewiesen, darunter Ste2p, Ste3p und Fur4p (Hicke *et al.*, 1998; Roth & Davis, 2000; Marchal *et al.*, 1998). Im HDEL-Rezeptor Erd2p konnten mehrere potentielle Ubiquitinierungsstellen identifiziert werden. Die Deletion von vier Lysinen im C-Terminus führte zu einer vollständigen K28-Resistenz. Die Enzyme, welche die Ubiquitinierung von Erd2p katalysieren, wurden bereits beschrieben und eine Interaktion der Ubiquitin-Ligase Rsp5p mit Erd2p nachgewiesen (Heiligenstein *et al.*, 2006; Dausend, 2010). Die Ubiquitinierung von Erd2p scheint folglich einen essentiellen Schritt während der Endozytose des Rezeptors darzustellen. Um dies auch fluoreszenz-

mikroskopisch verifizieren zu können, wurde die Lokalisation von Erd2 K/R-GFP, dem GFP-markierten Rezeptor, dessen C-terminale Lysinreste durch Arginin ersetzt wurden, mit der des wildtypischen Rezeptors verglichen. Da primär keine Unterschiede erkennbar waren (Dausend, 2010), wurden in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation und Mobilität dieser Rezeptorvariante näher untersucht. Dazu wurde die TIRF („total internal reflection fluorescence“) Mikroskopie eingesetzt. Diese Mikroskopie-Technik wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung endozytotischer Prozesse in Hefezellen angewendet (Kaksonen *et al.*, 2005). Die Intensität des durch Totalreflektion gebildeten evaneszenten Felds nimmt mit zunehmender Entfernung von der Grenzfläche Deckglas-Zelle exponentiell ab; sie reicht nur wenige 100 nm in die Probe. Daher werden nur Moleküle im Zellrandbereich, dem Bereich der Endozytose, angeregt. Dies erlaubt die Visualisierung von endozytotischen Prozessen in Echtzeit ohne störende Hintergrundsignale. Zur TIRF-Mikroskopie wurden BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] und BY4742 [pRS316 Erd2 K/R-GFP] in Galaktose-haltigem Medium zur Induktion der Proteinexpression kultiviert und anschließend auf Concanavalin A-beschichteten Deckgläsern immobilisiert. Wie in Abb. 57 dargestellt, konnte auch mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie kein Unterschied im Fluoreszenzmuster zwischen wildtypischem Erd2-GFP und der Erd2 K/R-GFP Rezeptorvariante detektiert werden. Die beobachtete punktuelle Fluoreszenz stammt von Rezeptoren in der Zellperipherie, an der Grenze zum Deckglas.

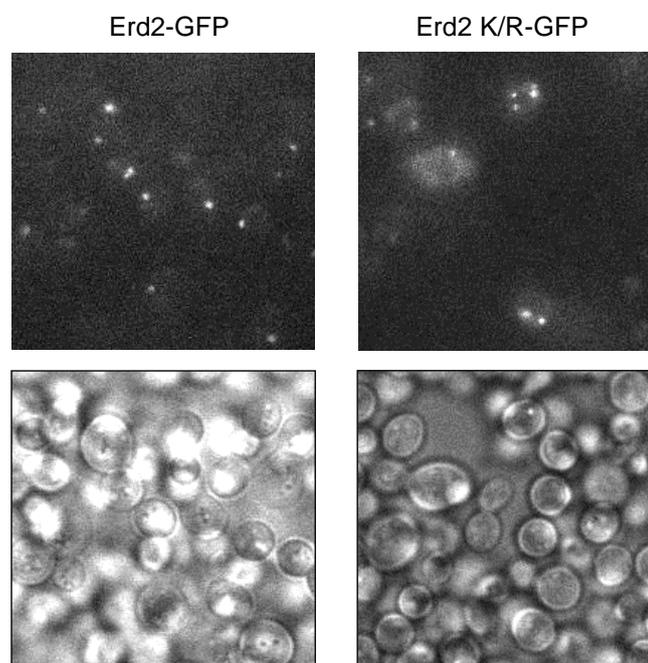


Abb. 57: TIRF-Mikroskopie von Erd2-GFP und Erd2 K/R-GFP. BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] und BY4742 [pRS316 Erd2 K/R-GFP] wurden in Galaktose-haltigem ura d/o Medium kultiviert, um die Proteinexpression zu induzieren. Dargestellt sind die GFP-Fluoreszenz sowie die Hellfeldaufnahmen. TIRF-Mikroskop: Quant EM Kamera, 100x/1.45 NA Plan Apochromat TIRF Objektiv, TILL-TIRF Kondensator, multi-line Argon Laser 1885F12, 488 nm.

In früheren Versuchen konnte bereits eine Bewegung der Erd2-GFP-Foci beobachtet werden. Daher wurde die Auswirkung der K/R-Substitution auf die Rezeptormobilität analysiert. Mittels TIRF-Mikroskopie wurden zweiminütige Aufnahmen mit einer Frequenz von 10 Hz erstellt und ein Tracking der Erd2-GFP Vesikel durchgeführt (Programm „Easy Track“). Als Maß für die Mobilität wurde der „caging diameter“ (CD) mit Hilfe des Programms „IGOR“ (WaveMetrics) berechnet. Dieser Wert beschreibt die maximale Strecke, die ein Partikel in einer bestimmten Zeiteinheit zurücklegt (Abb. 16; Nofal *et al.*, 2007). Als Ergebnis wurde die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD, normiert auf deren Gesamtzahl, erhalten (Abb. 58). Dargestellt sind Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwertes, wobei jeweils 150 Zellen analysiert wurden.

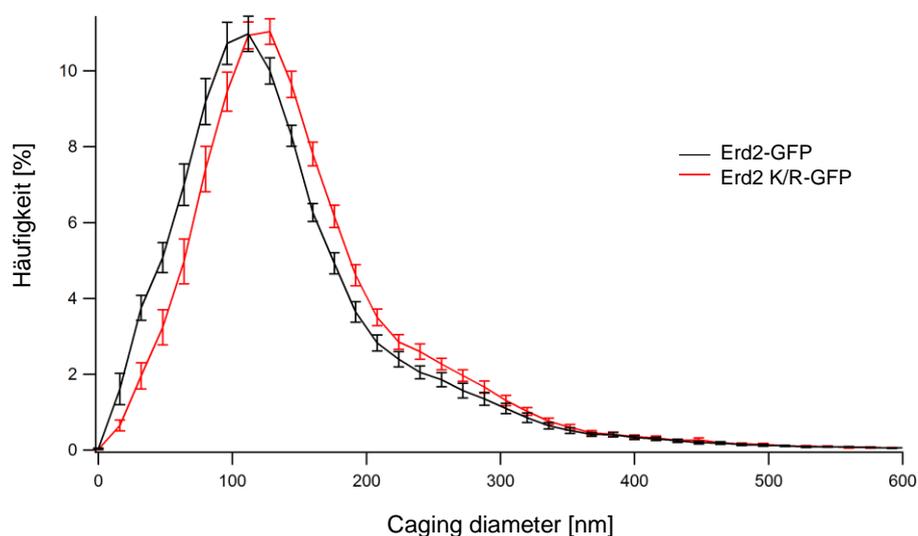


Abb. 58: Analyse der Mobilität von Erd2-GFP und Erd2 K/R-GFP: Bestimmung des „caging diameters“. BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] und BY4742 [pRS316 Erd2 K/R-GFP] wurden in Galaktose-haltigem ura d/o Medium kultiviert, um die Proteinexpression zu induzieren. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2 min, 10 Hz) wurden an einem TIRF-Mikroskop durchgeführt. Nach dem Tracking („Easy Track“) konnte der „caging diameter“ (CD) als Maß für die Mobilität in x,y-Richtung bestimmt werden (Nofal *et al.*, 2007). Dargestellt ist die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD-Werte, normiert auf deren Gesamtzahl sowie der Standardfehler des Mittelwerts ($N_{\text{individuelle Messungen}} = 15$, $n = 150$ Zellen).

Die Verteilung der CD-Werte zeigte eine leichte Verschiebung zwischen Erd2-GFP und Erd2 K/R-GFP. Die geringfügig höheren CD-Werte von Erd2 K/R könnten auf eine größere Beweglichkeit dieser Rezeptorvariante hindeuten, die jedoch keinesfalls als signifikant zu bewerten ist. Diese Methode ist dennoch geeignet, Mobilitätsunterschiede zu detektieren, wie unter Punkt 3.4.3.2 anhand der Endozytose-Mutante $\Delta end3$ dargestellt ist.

Da mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Techniken keine weitere Untersuchung der Rezeptorubiquitinierung möglich war, wurde im Folgenden die Relevanz der einzelnen Lysine im C-terminalen Lysin-Cluster von Erd2p analysiert. Zur Internalisierung von Erd2p scheint eine Monoubiquitinierung auszureichen, wie durch die Expression von mutiertem Ubiquitin (Ub^{K48R} oder Ub^{K63R}) in einer $\Delta doa4$ Mutante, welcher das wichtigste deubiquitinierende Enzym Doa4p fehlt, gezeigt werden konnte: Die K28-Sensitivität und damit die Erd2p-Endozytose blieben unverändert (Heiligenstein *et al.*, 2006). Dass eine Monoubiquitinierung zur Endozytose hinreichend sein kann, wurde erstmals für den Rezeptor Ste2p beschrieben (Terrell *et al.*, 1998). In dieser Arbeit sollte durch Substitution einzelner Lysine gegen Arginin die Frage beantwortet werden, ob die Ubiquitinierung des K28-Rezeptor Erd2p an mehreren Stellen, oder hauptsächlich an einem einzelnen Lysinrest stattfindet. Zusätzlich sollte durch Fusion einer Erd2p-Variante mit Ubiquitin bestätigt werden, dass eine Monoubiquitinierung zur Endozytose von Erd2p ausreicht.

Die einzelnen Lysin/Arginin-Substitutionen im C-Terminus von Erd2p wurden auf DNA-Ebene mittels PCR-Mutagenese durchgeführt. Dabei wurden die Lysinreste 208, 213, 216 oder 219 durch Arginin ersetzt. Zur Fusion mit Ubiquitin wurde eine *ERD2*-Variante amplifiziert, deren vier C-terminale Lysinreste durch Arginin ersetzt waren (*ERD2 K/R*). Mittels SOE-PCR wurde *ERD2 K/R* ohne Stopp-Codon mit Ubiquitin fusioniert. Dazu wurde eine Ubiquitin-Variante amplifiziert, deren sämtliche Lysine durch Arginin ersetzt waren. Zudem waren die beiden C-terminalen Glyzinreste deletiert, um eine Konjugation an andere Proteine zu verhindern (Roth & Davis, 2000). In den 5'- und 3'-Primern waren jeweils die entsprechenden Restriktionsschnittstellen zur weiteren Klonierung enthalten. Die Konstrukte wurden durch *EcoRI/SalI* Restriktion (*ERD2 K/R*-Varianten) bzw. *XhoI/BamHI* (*ERD2*-Ubiquitin) in den Vektor pRS316 Erd2.657 Reporter in die Expressionskassette eingebracht, so dass sie unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors vorlagen. Die Expressionskassette wurde durch *ApaI/SacI*-Restriktion in den Vektor pESC-LEU kloniert. Zur Expression der Erd2p-Varianten wurde der Hefestamm YA12 gewählt. Dieser besitzt keine funktionelle Kopie des *ERD2*-Gens, so dass nur die hergestellten Erd2-Varianten exprimiert werden und deren Funktionsfähigkeit bei der K28-Internalisierung getestet werden kann. Da Nullmutationen in *ERD2* letal sind, besitzt YA12 das Plasmid pYA12 (2 μ , *URA3*, *ADE3*, *SEC12*), wodurch der GDP/GTP-Austauschfaktor Sec12p, welcher bei der Vesikelbildung notwendig ist, konstitutiv exprimiert wird und so das Überleben der $\Delta erd2$ -Mutanten ermöglicht (Semenza *et al.*, 1990). YA12 wurde mit den Plasmiden pESC-LEU Erd2 K/R und pESC-LEU Erd2-Ubiquitin transformiert. Dieses „multi-copy“ Plasmid wurde gewählt, da die Anzahl der HDEL-Rezeptor-Kopien das Wachstum beeinflusst. Wurde *ERD2* über einen Centromer-Vektor exprimiert, zeigten die Transformanden Wachstumsdefekte (Townsend *et al.*, 1994)

Die erhaltenen Transformanden wurden zunächst in leu d/o Galaktose-Medium kultiviert und dann auf FOA-haltigen (0,1 %) leu d/o Galaktose Agarplatten ausgestrichen, wodurch das *URA3*-Plasmid pYA12 eliminiert wurde: Das *URA3*-Genprodukt setzt 5-Fluororotsäure (FOA) zu toxischem 5-Fluoruracil um. Durch den Selektionsdruck auf das Plasmid pESC-LEU bleibt dieses erhalten. Daher findet nur dann ein Wachstum der Transformanden auf FOA-Agar statt, wenn die konstruierte Erd2-Variante funktionell ist.

Die FOA-Selektion zeigte, dass alle fünf Erd2-Varianten funktionell waren. Als Negativkontrolle wurde eine Erd2-Variante mit einer Deletion der letzten 13 Aminosäuren im C-Terminus mitgeführt, welche nicht auf FOA-haltigem Medium wuchs und folglich nicht mehr funktionell war. Als Positivkontrolle diente das wildtypische *ERD2*-Gen ohne Intron (Dausend, 2010). Die Einzelsubstitutionen der C-terminalen Lysine gegen Arginin beeinträchtigten wie erwartet nicht die Funktionalität des Proteins, da auch die gleichzeitige Mutation aller vier Lysine keinen negativen Effekt hatte. Auch durch die C-terminale Ubiquitin-Fusion scheint die Funktionalität von Erd2p erhalten zu bleiben.

Die hergestellten Stämme YA Erd2 K/R₂₀₈, YA Erd2 K/R₂₁₃, YA Erd2 K/R₂₁₆, YA Erd2 K/R₂₁₉ und YA Erd2 K/R Ubiquitin wurden auf ihre Toxinsensitivität gegen K28 getestet (Abb. 59). Wie erwartet verhielt sich die *erd2*-Mutante YA12 K28-resistent. Aufgrund von starken Wachstumsunterschieden, wurden pro konstruiertem Stamm mindestens sechs Klone verschiedener Transformationsansätze und FOA-Selektionen getestet. Die entsprechend großen Standardabweichungen erschweren die Auswertung. Allerdings scheinen die Einzelsubstitutionen jeweils zu einer leicht verminderten K28-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp YA Erd2 zu führen, wohingegen die Expression des Fusionsproteins aus Erd2p und Ubiquitin eine signifikante Reduktion der K28-Toxizität bewirkte. Folglich hatte diese Fusion einen negativen Einfluss auf die K28-Aufnahme und den intrazellulären Toxintransport, was auf eine reduzierte Erd2p-Kopienzahl an der Plasmamembran durch die eventuell gesteigerte Endozytose oder eine Beeinträchtigung des intrazellulären Transports des HDEL-Rezeptors bis in das ER zurückzuführen sein kann. Überraschenderweise zeigte sich der Stamm YA Erd2 K/R nicht wie von Dausend (2010) beschrieben K28-resistent, sondern bildete ebenfalls einen, wenn auch leicht verminderten, sensitiven K28-Phänotyp aus. Dieses Phänomen erklärt auch die unveränderte Mobilität der Erd2 K/R-GFP-Rezeptorvariante und die fehlenden Auswirkungen der K/R-Einzelsubstitutionen. Somit scheint dem C-terminalen Lysincluster keine essentielle Bedeutung bei der Erd2p-Endozytose zuzukommen.

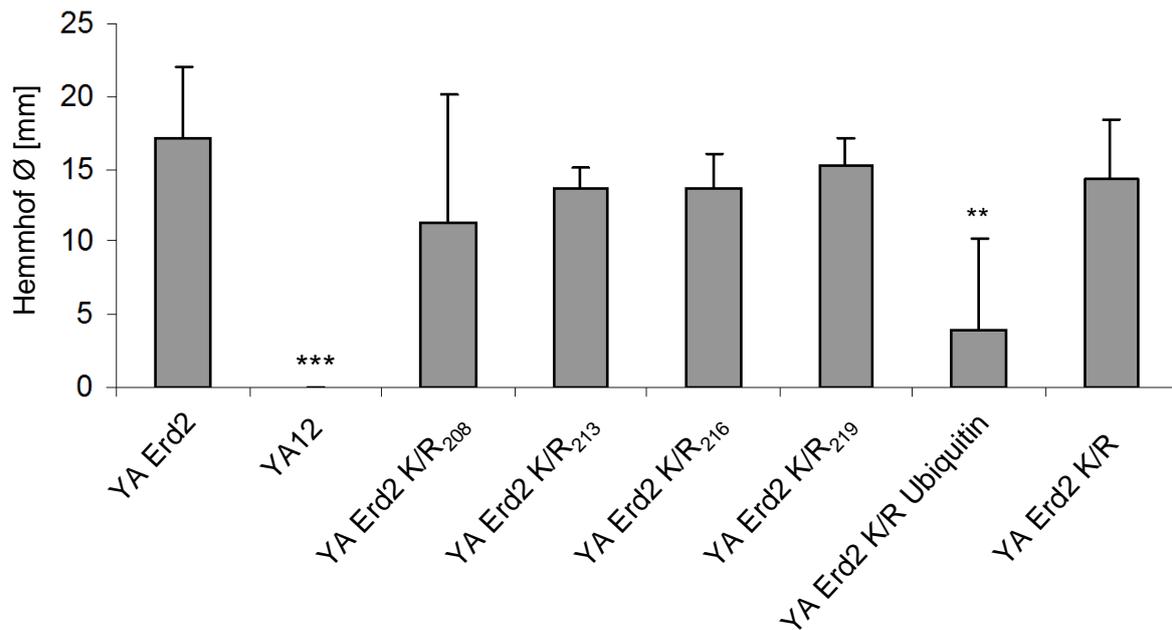


Abb. 59: K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression von Erd2p-Varianten. 1×10^6 Zellen von *S. cerevisiae* YA [pESC-leu Erd2.x] oder YA12 (Δ erd2) wurden in Minimal-Methylenblau-Galaktose-Agar eingebettet, 100 μ l K28-Toxinkonzentrat (10fach) in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 - 10 d Inkubation bei 20 °C bestimmt. Aufgrund von starken Wachstumsunterschieden wurden jeweils sechs Klone aus verschiedenen Transformationsansätzen getestet, die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung angegeben. Als Referenz für die statistische Auswertung wurde der Wildtyp YA [pESC-leu Erd2] herangezogen (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.4.3. Untersuchungen zur Endozytose von K28/Erd2p: Relevanz weiterer Endozytosemotive

Neben der Endozytose entlang des „PURE-Pathway“, wobei Phosphorylierung und Ubiquitinierung eine zentrale Rolle spielen, existieren weitere Endozytose-Signale in *S. cerevisiae*. An diese Erkennungsstellen binden Proteine, welche eine Adaptor-Funktion ausüben, da sie das zu endozytierende Cargo-Protein mit der Clathrin-Hülle oder dem Aktinzytoskelett verbinden. Die Ubiquitinierung eines Plasmamembranproteins kann von Ede1p oder Epsinen wie Ent1p und Ent2p erkannt werden (Toshima *et al.*, 2009). Ebenso können Sla1p, Yap1801p/Yap1802p oder der AP-2 Komplex als Adaptoren fungieren, wobei die Interaktion ebenfalls durch spezifische Internalisierungsmotive vermittelt wird. Da eine Beteiligung der Adaptorproteine YAP1801/2p an der K28/Erd2p-Endozytose nicht nachgewiesen werden konnte (Punkt 3.4.1), sollte im Folgenden die Rolle von Sla1p sowie des AP-2 Komplex bei der Toxin-Internalisierung definiert werden.

3.4.3.1. Funktion von Sla1p bei der K28/Erd2p-Internalisierung

Sla1p, eine Komponente des Pan1-Komplexes, fungiert als Clathrin-Adaptor und kann das zu endozytierende Protein mit der Clathrin-Hülle verbinden. Sla1p konnte als Cargo-spezifischer Adaptor von Wsc1p und Ste2p identifiziert werden. Die Bindung wird durch eine Interaktion der SHD1-Domäne von Sla1p mit dem NPF_{X(1,2)}D-Motiv des zu endozytierenden Proteins vermittelt (Piao *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2002). Auf eine Beteiligung von Sla1p an der K28/Erd2p-Internalisierung deuten bereits Untersuchungen von Heiligenstein (2008) hin: Eine $\Delta sla1$ -Deletionsmutante verhielt sich im Agardiffusionstest resistent gegen K28. Des Weiteren konnte im N-Terminus von Erd2p ein NPF_{X(1,2)}D ähnliches Motiv identifiziert werden. Dessen Deletion führte zu einer verminderten K28-Sensitivität (Dausend, 2010). Alternativ könnte das NPF-Motiv auch von Proteinen erkannt werden, welche EH-Domänen besitzen (Salcini *et al.*, 1997). Das Erd2p-eigene NPF-Signal (NPF_{RILGD}) stimmt nicht exakt mit dem in der Literatur beschriebenen NPF_{X(1,2)}D-Motiv überein, für welches die Interaktion mit Sla1p-SHD1 nachgewiesen wurde. Daher sollte die Funktion dieses Signal-Peptids während der Erd2p-Endozytose untersucht werden. Dazu wurde die K28-Sensitivität einer Hefe bestimmt, welche eine mutierte Form von Sla1p unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert, deren SHD1-Domäne deletiert wurde. Im Unterschied zu einer vollständigen Deletion von *SLA1*, behält die Mutante *sla1 Δ shd1* ihre weiteren Funktionen in der Ubiquitin-vermittelten Endozytose und der Aktinpolymerisation (Howard *et al.*, 2002).

Wie Abb. 60 zeigt, führte die Deletion von *SLA1* zu einer vollständigen K28-Resistenz. Durch Expression von wildtypischem Sla1p konnte die K28-Sensitivität wieder hergestellt werden. Die Deletion der SHD1-Domäne verursachte eine Reduktion der K28-Sensitivität. Dies entspricht dem Phänotyp, welcher durch eine Deletion des entsprechenden Interaktionsmotivs von Erd2p entsteht: Die Deletion des NPF-Signals führte ebenfalls zu einer verminderten Sensitivität der Hefen gegenüber K28 (Dausend, 2010). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit deutet daher auf eine Interaktion von Sla1p und Erd2p hin, die durch das Erd2p-eigene NPF_{X(1,2)}D-ähnliche Motiv und die SHD1-Domäne von Sla1p vermittelt wird.

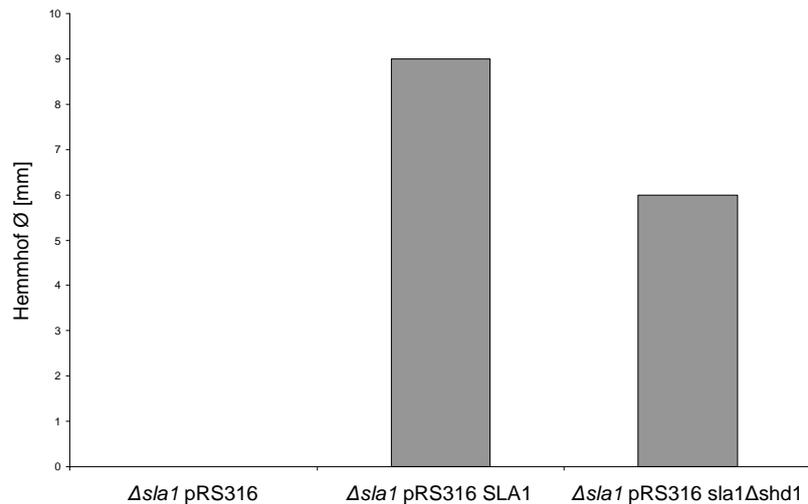


Abb. 60: K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression von Sla1p-Varianten. 1×10^6 Zellen wurden in his d/o-Methylenblau-Glukose Agar eingebettet, 100 μ l K28-Toxinkonzentrat (10fach) in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 d Inkubation bei 20 °C bestimmt. Der Hemmhofdurchmesser des Wildtyps BY4742 betrug 9 mm.

3.4.3.2. Beteiligung des AP-2 Komplexes an der K28/Erd2p-Internalisierung

In höheren eukaryotischen Zellen kann die Verbindung des zu endozytierenden Membranproteins mit der Clathrin-Hülle durch den AP-2 Komplex gebildet werden. Dieser heterotetramere Komplex rekrutiert außerdem akzessorische und regulatorische Proteine, welche an der Endozytose beteiligt sind (Pearse *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* wurde für die Deletion homologer Gene bisher kein nachweisbarer endozytotischer Phänotyp beschrieben; der AP-2 Komplex scheint nicht bei der Endozytose in Hefe beteiligt zu sein (Sorkin 2004; Yeung *et al.*, 1999). Ein Screening von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten bezüglich ihrer K28-Sensitivität ergab, dass sich Deletionsmutanten aller Untereinheiten des AP-2 Komplexes resistent gegen K28 verhielten (Heiligenstein, 2008). Auf welcher Stufe der Toxin-Internalisierung und des retrograden Transportes sich die Toxinresistenz manifestiert, konnte bisher nicht eindeutig festgestellt werden (Sendzik, 2006). Im Folgenden sollten daher die bisherigen Ergebnisse bestätigt und die Beteiligung des AP-2 Komplexes an der K28/Erd2p-Internalisierung näher charakterisiert werden.

Einfluss des AP-2 Komplexes auf die K28-Sensitivität

Der heteromere AP-2 Komplex besteht aus vier Untereinheiten, deren Funktion in Säugerzellen genau untersucht wurde (Traub, 2009; Jackson *et al.*, 2010). Dazu zählen zwei große Untereinheiten (α und $\beta 2$), eine mittlere ($\mu 2$) und eine kleine Untereinheit (σ). Die großen Untereinheiten können wiederum unterteilt werden in einen Hauptteil, welcher durch einen flexiblen Linker mit einer weiteren Domäne verbunden ist. Dieser Teil der $\beta 2$ -Untereinheit stellt die Verbindung mit der Clathrin-Hülle her (Pearse *et al.*, 2000).

Anhand von Sequenzvergleichen konnten entsprechende Homologe auch in *S. cerevisiae* identifiziert werden (Yeung *et al.*, 1999). Wie durch Agardiffusionstests bestätigt werden konnte, zeigen *S. cerevisiae* Deletionsmutanten der einzelnen Untereinheiten K28-Resistenz (Tab. 19). Entsprechend der Situation in Säugerzellen interagieren auch die Untereinheiten des AP-2 Komplexes der Hefe physikalisch miteinander, so dass die Deletion einer Untereinheit die Bildung des tetrameren Komplexes verhindert (Yeung *et al.*, 1999). Als Kontrolle wurden Mutanten mitgeführt, welche in Untereinheiten der Adaptor-Komplexe AP-1 und AP-3 deletiert waren. Diese sind in verschiedenen Punkten des intrazellulären Transportes involviert: Der Clathrin-abhängige Transport zwischen *trans*-Golgi-Netzwerk und den Endosomen wird durch den AP-1 Komplex vermittelt (Traub, 2005). Der AP-3 Komplex ist am Clathrin-unabhängigen Transport vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur Vakuole beteiligt (Anand *et al.*, 2009). Die Deletionsmutanten dieser beiden Komplexe zeigten im K28-Sensitivitätstest keinen Unterschied zum Wildtyp. Diese Ergebnisse bestätigen einen Einfluss des AP-2 Komplexes auf die K28-Sensitivität von *S. cerevisiae*.

Tab. 19: K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* Deletionsmutanten der einzelnen AP-2 Komplex Untereinheiten. 1×10^6 Zellen wurden in Minimal-Methylenblau-Glukose Agar eingebettet, 100 μ l K28-Toxinkonzentrat (200fach) in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 d Inkubation bei 20 °C bestimmt.

<i>S. cerevisiae</i>	Funktion des Genproduktes	Hemmhof Ø [mm]
WT		13
$\Delta ap1$	AP-2 Komplex β 2-Untereinheit	0
$\Delta ap3$	AP-2 Komplex α -Untereinheit	0
$\Delta apm4$	AP-2 Komplex μ 2-Untereinheit	0
$\Delta aps2$	AP-2 Komplex σ -Untereinheit	0
$\Delta ap2$	AP-1 Komplex β 1-Untereinheit	13
$\Delta ap6$	AP-3 Komplex β 3-Untereinheit	13

Einfluss des AP-2 Komplexes auf die K28-Internalisierung: Zellfraktionierungs- und Toxinaufnahmestudien

Um die Beteiligung des AP-2 Komplexes an der K28-Internalisierung oder dem retrograden Transport näher charakterisieren zu können, wurde die Lokalisation der AP-2 Untereinheiten durch GFP-Fusionen untersucht. Dabei wurden sowohl Apl1-GFP als auch Apm4-GFP in kortikalen Bereichen lokalisiert, die der Endozytose-Maschinerie zugeordnet werden konnten (Carroll *et al.*, 2009). Die Lokalisation des AP-2 Komplexes und die Bedeutung für die K28-Toxizität deuten auf eine mögliche Beteiligung des Komplexes bei der Toxinaufnahme, der Endozytose des K28/Erp2-Komplexes hin. Durch Zellfraktionsierungsstudien von K28-behandelten Sphäroplasten verschiedener AP-2-Deletionsmutanten sollte diese Annahme bestätigt werden. Wie unter Punkt 2.5.7 beschrieben, wurden Sphäroplasten mit osmotisch stabilisiertem K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Nach einem milden Zellaufschluss erfolgte die differentielle Zentrifugation zur Trennung der Kompartimente. Der Toxinnachweis sowie die Detektion von Markerproteinen zur Bestimmung der Reinheit der Fraktionierung wurden durch Western-Analyse erreicht.

Die Ergebnisse sind in Abb. 61 a) dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Menge an K28 in den jeweiligen Fraktionen zwischen den Experimenten variiert und eine quantitative Auswertung nicht durchgeführt werden konnte. Wildtypische Hefezellen sowie $\Delta apl2$ - und $\Delta apl6$ -Deletionsmutanten akkumulierten K28 in der zytosolischen Fraktion (S100), Signale konnten außerdem in der endosomalen Vesikelfraktion (P100), der intrazellulären Membranfraktion (P13) und der Zellwandfraktion (P1) detektiert werden. Die Deletion von *APL1* und *APL3* verhinderte eine K28-Akkumulation im Zytosol. Auch eine als Kontrolle mitgeführte $\Delta end3$ -Mutante zeigte keine Toxinakkumulation in der zytosolischen Fraktion, was dem Ergebnis von Eisfeld *et al.* (2000) entspricht. Die Deletion von *END3* führt zu einer K28-Resistenz, was auf einen Defekt der Endozytose zurückzuführen ist. Das Vorhandensein von K28 in der endosomalen Vesikelfraktion (P100) in $\Delta apl1$, $\Delta apl3$ und $\Delta end3$ könnte durch eine nicht vollständig blockierte Endozytose bedingt sein.

Um die genaue Verteilung der Organellen bei der Zellfraktionierung zu verifizieren, wurden Markerproteine in den Fraktionen nachgewiesen (Abb. 61 b). Als Marker für die intrazelluläre Membranfraktion (P13) konnte Sec61p detektiert werden. Das ER-Membranprotein war ausschließlich in dieser Fraktion lokalisiert. Pep12p, ein t-SNARE, ist am Vesikeltransport zwischen Endosomen, Golgi und Vakuole beteiligt. Das Markerprotein wurde in der intrazellulären Membranfraktion (P13) und der endosomalen Vesikelfraktion (P100) nachgewiesen. Als Marker für die zytosolische Fraktion dienten β -Aktin und die Phosphofruktokinase. Beide waren im Zytosol (S100) und weiteren Fraktionen nachweisbar.

Die subzelluläre Fraktionierung K28-behandelter Sphäroplasten konnte somit das Ergebnis des Sensitivitätstests bestätigen, K28 erreicht in AP-2-Deletionsmutanten nicht das Zytosol. Das gleiche Ergebnis zeigte die Zellfraktionierung einer Endozytosemutante, $\Delta end3$.

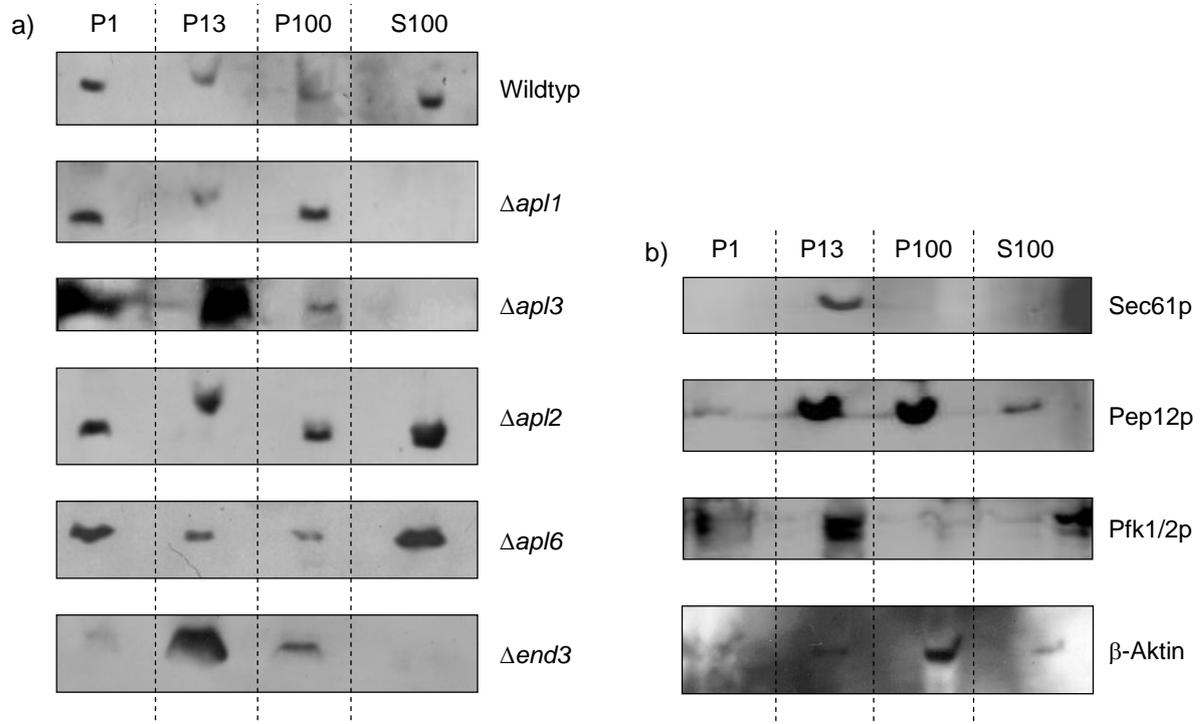


Abb. 61: Western-Analyse subzellulärer Fraktionen von *S. cerevisiae* AP-2-Deletionsmutanten nach Inkubation mit K28-Toxinkonzentrat. BY4742 (Wildtyp) und die entsprechenden Deletionsmutanten wurden sphäroplastiert, mit K28 2 h inkubiert und im Homogenisator aufgeschlossen. Nach differentieller Zentrifugation wurden die Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Toxinnachweis erfolgte mit polyklonalen anti-K28-Antikörpern und einem sekundären HRP-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper. Die Chemilumineszenzreaktion wurde auf Röntgenfilm detektiert (a). Der Nachweis der Markerproteine (b) erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Sec61p, Pep12p, Pfk1/2p und β -Aktin.

P1: Zellwand

P13: intrazelluläre Membranfraktion (ER-Membran, Plasmamembran, vakuoläre Membran, Mitochondrien)

P100: endosomale Vesikelfraktion (Endosomen, Vesikel, Golgi-Membranen)

S100: zytosolische Fraktion

Um zu bestätigen, dass die Deletion der AP2-Komplex Untereinheiten zu einem Defekt in der Toxinaufnahme führt, wurde die Toxinmenge im zellfreien Überstand von Sphäroplasten nach Inkubation mit K28 analysiert. Dazu wurden die Sphäroplasten mit Toxinkonzentrat inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten die K28-Menge im Überstand mittels Western-Analyse bestimmt (Abb. 62). Die Toxinmenge im Überstand wildtypischer Zellen nahm im Zeitverlauf ab, was auf eine K28-Internalisierung schließen lässt. Die K28-Menge der Stabilitätskontrolle, welche nur aus Toxinkonzentrat und Puffer bestand, blieb konstant. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Abnahme der K28-Konzentration im

Überstand wildtypischer Zellen auf einen Toxinabbau zurückzuführen ist. Die Inkubation von K28 mit $\Delta end3$ oder $\Delta apl1$ führte nicht zu einer Abnahme der Toxinmenge im Überstand; die K28-Menge blieb konstant. $\Delta end3$ diente als Kontrolle, da diese Deletion durch Endozytose-Defekte zu einer K28-Resistenz führt (Eisfeld *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis bekräftigt die Annahme, dass der AP-2 Komplex in die K28-Endozytose involviert ist.

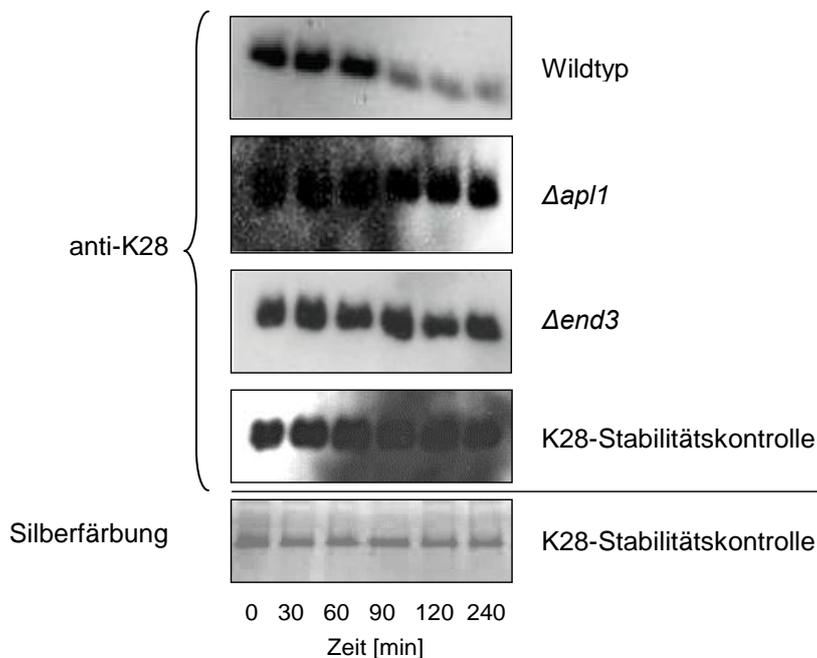


Abb. 62: Indirekte Bestimmung der K28-Aufnahme durch Deletionsmutanten des AP-2 Komplexes. Wildtypische (BY4742) oder $\Delta apl1$ bzw. $\Delta end3$ -Hefezellen wurden sphäroplastiert und 4 h mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Zur K28-Stabilitätskontrolle wurde K28 mit Puffer ohne Zusatz von Sphäroplasten inkubiert. Zur Bestimmung der Menge an nicht aufgenommenem Toxin wurde der zellfreie Überstand im SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Toxinnachweis erfolgte mit polyklonalen, dialysierten anti-K28-Antikörpern und einem sekundären HRP-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper. Die Chemilumineszenzreaktion wurde auf Röntgenfilm detektiert. Zur Detektion der Stabilitätskontrolle wurde zusätzlich eine Silberfärbung des SDS-Gels durchgeführt.

Einfluss des AP-2 Komplexes auf die Erd2p-Mobilität und -Verweildauer an der Plasmamembran

Wie aus den vorherigen Experimenten hervorgeht, scheint der AP-2 Komplex an der K28-Endozytose beteiligt zu sein. Die Deletion einzelner Untereinheiten des Komplexes verhinderte die K28-Internalisierung und führte zu einer Toxinresistenz. In Säugerzellen wurde die Beteiligung des AP-2 Komplexes an der Endozytose bereits eingehend untersucht, unter anderem mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten AP-2 Komplex-Untereinheiten (Taylor *et al.*, 2011). Dabei wurde die TIRF-Mikroskopie genutzt, um die Vesikelabschnürung im Zellrandbereich in Echtzeit verfolgen zu können.

In Hefezellen wurde die Lokalisation der K28-Rezeptors Erd2p ebenfalls mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht. Dazu wurde die Expression des GFP-markierten,

biologisch aktiven HDEL-Rezeptors optimiert, um präzise Lokalisationsstudien durchführen zu können (vgl. Punkt 3.3.2 sowie Dausend, 2010). Um die Beteiligung des AP-2 Komplexes bei der K28/Erd2p-Internalisierung bestätigen zu können, sollte der Einfluss des Komplexes auf die Erd2p-Mobilität bestimmt werden. Durch Deletion von Untereinheiten des AP-2 Komplexes sollte die Internalisierung von K28 und damit die Endozytose seines Rezeptors Erd2p beeinträchtigt sein. Die Mobilitätsanalyse wurde wie unter Punkt 3.4.2.2 beschrieben durchgeführt, wobei ein wildtypischer Stamm (BY4742) mit $\Delta apl1$ - und $\Delta end3$ -Deletionsmutanten verglichen wurde. Die zu untersuchenden Hefestämme wurden mit dem Plasmid pRS316 Erd2-GFP transformiert und die Expression von Erd2-GFP durch Zugabe von Galaktose induziert. Abb. 63 zeigt den GFP-markierten Rezeptor Erd2p in $\Delta apl1$, $\Delta end3$ und wildtypischen Zellen. Die TIRF-Aufnahmen, welche nur Rezeptoren im Zellrandbereich darstellen, ergaben ein punktuelles Fluoreszenzmuster, wobei keine Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen waren.

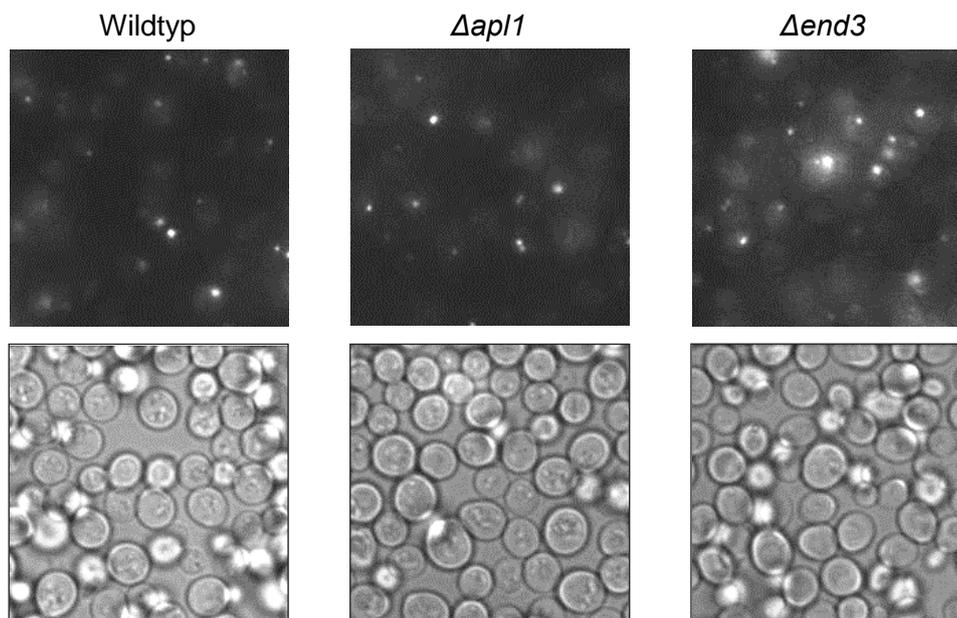


Abb. 63: TIRF-Mikroskopie von Erd2-GFP in $\Delta apl1$ - und $\Delta end3$ -Deletionsmutanten. BY4742, $\Delta apl1$ und $\Delta end3$ wurden mit pRS316 Erd2-GFP transformiert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert. Dargestellt sind die GFP-Fluoreszenz sowie die Hellfeldaufnahmen. TIRF-Mikroskop: Quant EM Kamera, 100x/1.45 NA Plan Apochromat TIRF Objektiv, TILL-TIRF Kondensator, multi-line Argon Laser 1885F12, 488 nm.

Erst die Analyse der Rezeptormobilität durch Bestimmung des CD ermöglichte eine genaue Aussage. Abb. 64 a) zeigt die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD, normiert auf deren Gesamtzahl. Pro Stamm wurden 180 Zellen analysiert; dargestellt sind der Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes.

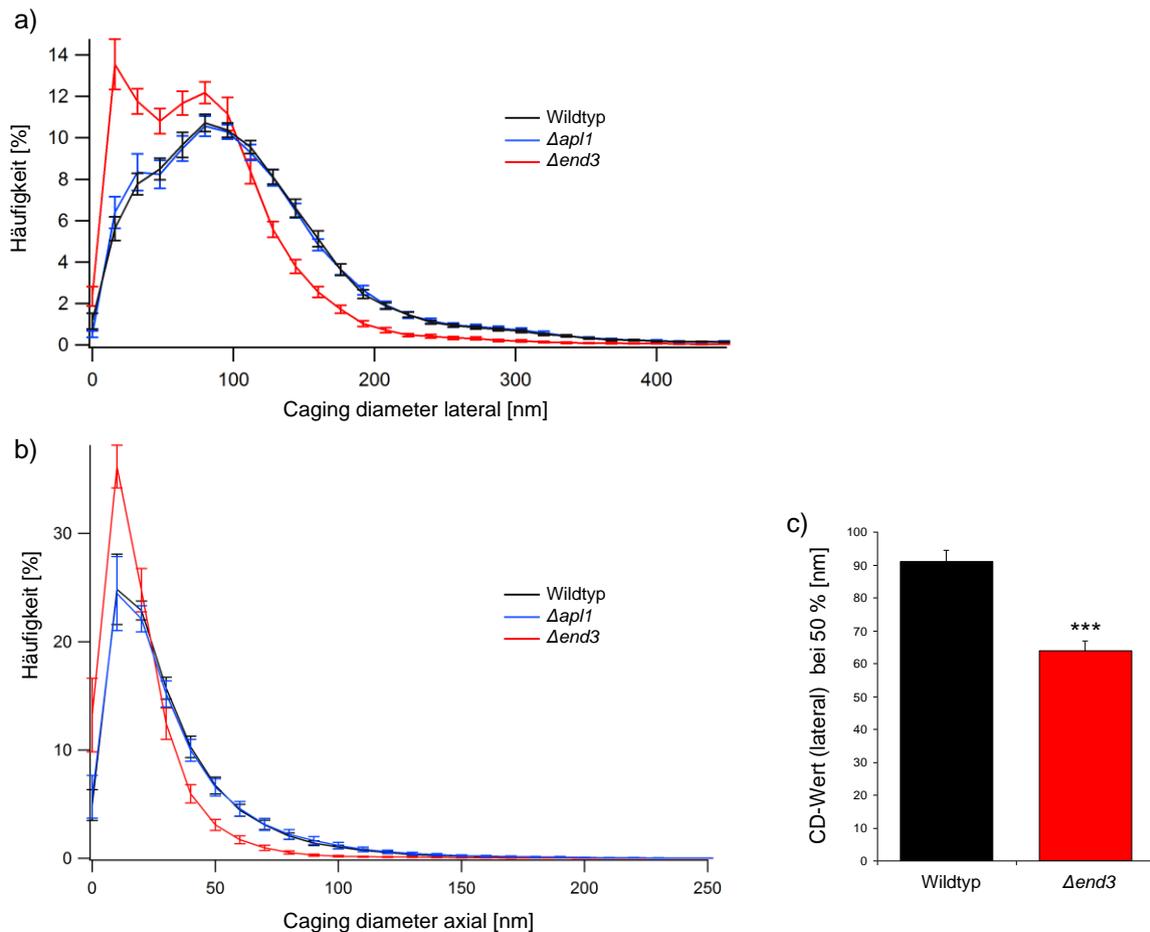


Abb. 64: Analyse der Mobilität von Erd2-GFP in *Δapl1*- und *Δend3*-Deletionsmutanten durch Bestimmung des „caging diameter“. BY4742, *Δapl1* und *Δend3* wurden mit pRS316 Erd2-GFP transformiert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem TIRF-Mikroskop durchgeführt. **a)** und **b)** Normalisierte „caging diameter“ (CD) Verteilung. Zur Mobilitätsbestimmung wurde ein Tracking von Erd2-GFP in zweiminütigen Aufnahmen (10 Hz) vorgenommen und der CD-Wert als Maß für die Mobilität bestimmt (Nofal *et al.*, 2007). Dargestellt ist die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD-Werte, normiert auf deren Gesamtzahl sowie der Standardfehler des Mittelwerts. a) x,y -Richtung; b) z-Richtung. **c)** Die Diagramme aus a) wurden integriert und der CD-Wert berechnet, der von 50 % aller CD-Werte erreicht wurde ($N_{\text{individuelle Messungen}} = 15$, $n = 180$ Zellen, *** $p < 0,001$).

Die *Δapl1*-Deletionsmutante wies keine veränderte Mobilität von Erd2-GFP, verglichen mit dem Wildtyp BY4742, auf. Die *Δend3*-Deletionsmutante, welche als Kontrolle mitgeführt wurde, zeigte eine verminderte Mobilität im Vergleich zum Wildtyp. Die Analyse der Mobilität in z-Richtung führte zum gleichen Ergebnis (Abb. 64 b). Die Anzahl der kleinen CD-Werte war bei der *Δend3*-Deletionsmutante deutlich erhöht, die Mobilität ist stark eingeschränkt. Auch der CD-Wert, der von 50 % aller Werte erreicht wird, war im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt (Abb. 64 c; $N_{\text{individuelle Messungen}} = 15$, $n = 180$ Zellen, $p < 0,001$).

Dieses Ergebnis bestätigt Erd2p als Plasmamembranprotein und seine Endozytose, da die einzig bekannte Funktion von End3p der Endozytose zuzuordnen ist. Die Deletion von *END3* führt zu einer erhöhten Lebenszeit von endozytotischen Proteinen wie Pan1p (Kaksonen *et al.*, 2005). Daher wurde die Verweildauer von Erd2-GFP im Bereich der Plasmamembran bestimmt, indem die Anzahl der Bilder, auf denen ein Erd2-GFP Signal vorhanden war, durch zehn geteilt und prozentual in Zehner-Gruppierungen in einem Diagramm dargestellt wurde (Abb. 65).

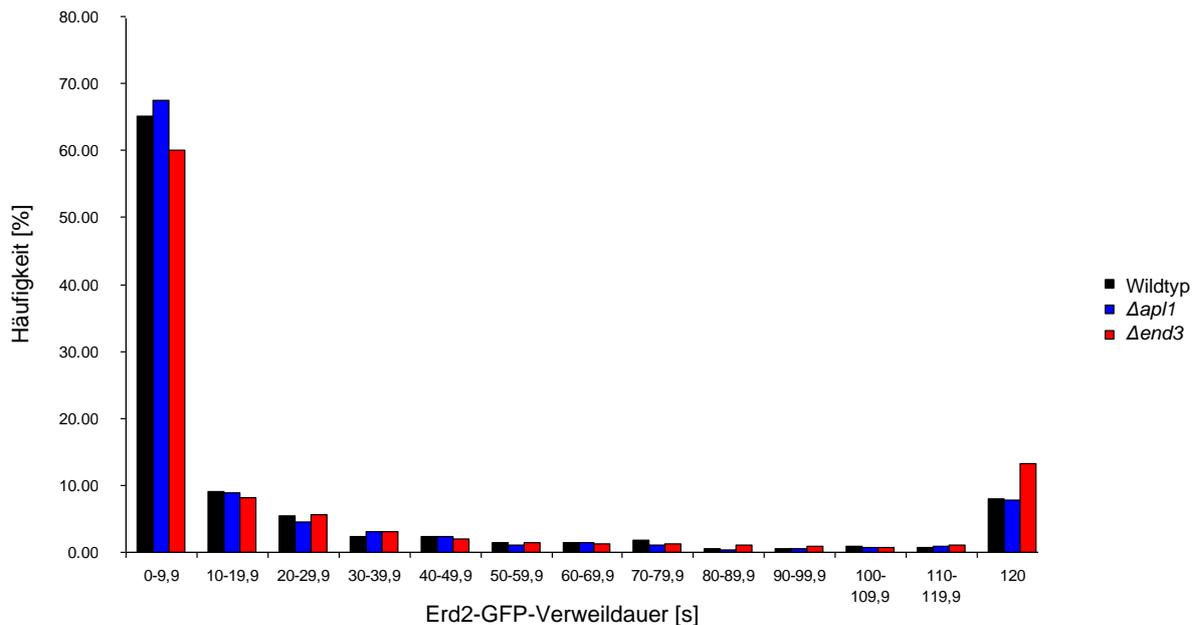


Abb. 65: Verweildauer von Erd2-GFP an der Plasmamembran in $\Delta apl1$ - und $\Delta end3$ -Deletionsmutanten. Grundlage der Analyse waren zweiminütige TIRF-Aufnahmen (10 Hz) von BY4742, $\Delta apl1$ oder $\Delta end3$, transformiert mit pRS316 Erd2-GFP, gefolgt, von einem Tracking der Erd2-GFP Vesikel. Die Anzahl der Bilder, auf denen ein Erd2-GFP-Vesikel vorhanden war, wurde durch zehn geteilt und prozentual in Zehner-Gruppierungen dargestellt. Pro Stamm wurden 180 Zellen analysiert.

Das Ergebnis der CD-Analyse konnte bestätigt werden. Die Erd2-GFP-Verweildauer im Bereich der Plasmamembran unterschied sich nicht zwischen wildtypischen Zellen oder einer $\Delta apl1$ -Deletionsmutante. Jedoch war die Erd2-GFP-Verweildauer durch Deletion von *END3* deutlich erhöht. Die Anzahl an Erd2-GFP Vesikeln mit geringer Verweildauer (bis 10 s) war erniedrigt, wobei ein klarer Anstieg bei einer Verweildauer ≥ 2 min erkennbar war. Die genaue Analyse des Zeitraums von 0 bis 10 s konnte keine weiteren Unterschiede aufdecken.

Die Analyse der Erd2p-Mobilität konnte keinen Einfluss des AP-2 Komplexes aufzeigen; die Deletion von *APL1* hatte keinen Effekt auf die Mobilität oder Verweildauer der Erd2-GFP Vesikel. Allerdings konnte der Einfluss des an der Endozytose beteiligten Proteins End3p auf die Erd2p Mobilität eindeutig nachgewiesen und somit die Endozytose des K28-Rezeptors Erd2p bestätigt werden (vgl. Punkt 3.3).

Kolokalisation des AP-2 Komplexes mit Erd2p

Wie im vorherigen Punkt gezeigt wurde, beeinflusst der AP-2 Komplex nicht die Mobilität oder Verweildauer des K28-Rezeptors Erd2p im Bereich der Plasmamembran. Eine Beteiligung an der K28-Endozytose konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Lokalisation des AP-2 Komplexes deuten ebenfalls auf eine Funktion bei der Endozytose hin: Apl1-GFP (β 2-Untereinheit) und Apm4-GFP (μ 2-Untereinheit) konnten als punktuelle Strukturen im Zellrandbereich detektiert werden, welche mit endozytotischen Proteinen wie Sla1p kolokalisierten (Carroll *et al.*, 2009). Die Funktion des AP-2 Komplexes in Säugerzellen besteht in der Verbindung des zu internalisierenden Proteins mit der Clathrin-Hülle. Folglich sollte der AP-2 Komplex auch den K28-Rezeptor Erd2p mit dem Clathrin-Gerüst verknüpfen. Um diese Theorie zu bekräftigen, sollte die Lokalisation des HDEL-Rezeptors mit der des AP-2 Komplexes verglichen werden.

Die funktionelle Erd2-GFP Rezeptorvariante, welche bereits erfolgreich zu fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet wurde (siehe oben), sollte zu Kolokalisationsstudien mit einer Apm4-mCherry Fusion eingesetzt werden. *APM4* wurde amplifiziert, wobei genomische *S. cerevisiae* DNA als Template diente, und durch *Xho*I/*Spe*I-Restriktion in den Vektor pRS315_mCherry (Sevrieva, 2009) eingebracht. Die Funktionalität der Apm4-mCherry Variante konnte durch einen K28-Sensitivitätstest nachgewiesen werden: Die Expression von Apm4-mCherry in einer Δ *apm4*-Deletionsmutante stellte die wildtypische K28-Sensitivität wieder her. Nach Transformation von BY4742 mit pRS315 Apm4-mCherry ergaben sich abhängig von der Induktionsdauer unterschiedliche Fluoreszenzmuster. Nach 5 h fluoreszierten die Zellen einheitlich, distinkte Strukturen waren nicht zu erkennen. Wurde die Induktionsdauer auf 24 h erhöht, zeigte sich eine starke Fluoreszenz im Bereich der Vakuole. Da die Überexpression von Apm4-mCherry zu einer Fehllokalisierung, gefolgt von einem vakuolären Abbau des Fusionsproteins führte, wurde eine Apm4-GFP Fusion unter Kontrolle des endogenen Promotors gewählt (YOL062cGFPclone, Huh *et al.*, 2003). Dieser Stamm zeigte wildtypische K28-Sensitivität, was auf eine Funktionalität des Apm4-GFP Fusionsproteins schließen lässt. Zur Kolokalisation von Apm4-GFP mit Erd2p wurde GFP im Vektor pRS316 Erd2-GFP durch mCherry ersetzt. Um wiederum die Funktionalität dieser Erd2-mCherry-Fusion zu untersuchen, wurde analog zu Punkt 3.4.2.2 vorgegangen: Erd2-mCherry wurde einschließlich der Expressionskassette aus pRS316, bestehend aus Galaktose-induzierbarem Promotor und *CYC1*-Terminator, in den Vektor pESC-LEU kloniert. Nach Transformation von YA12 mit pESC-LEU Erd2-mCherry und FOA-Selektion ermöglichte die Erd2-mCherry-Variante ein Wachstum der Δ *erd2*-Mutante, was die Funktionalität des Fusionsproteins bestätigt. Da die Fusion mit einem Fluoreszenzprotein weder bei Apm4p noch bei Erd2p zu einem Verlust der Funktionalität führte, konnte diese Variante zu Kolokalisationsstudien eingesetzt werden (Abb. 66).

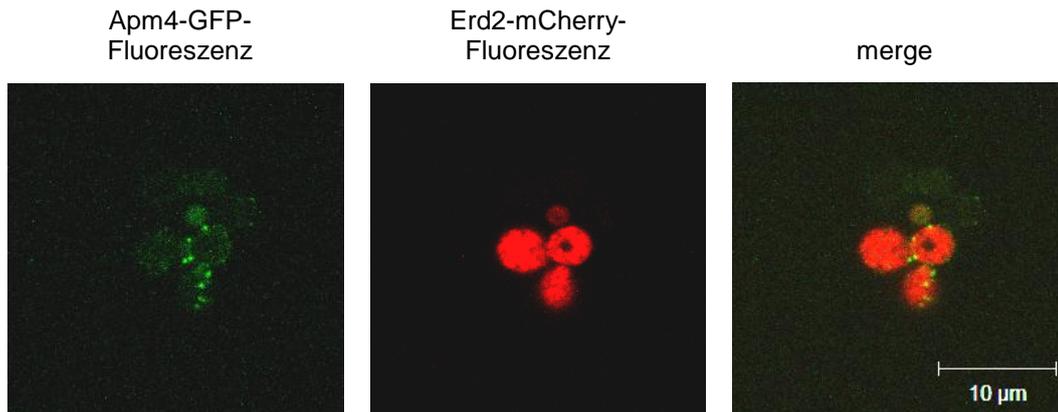


Abb. 66: Fluoreszenzmikroskopie von YOL062cGFPclone [pRS316 Erd2-mCherry] zur Lokalisation von Apm4-GFP und Erd2-mCherry. Nach 1 d Induktion in *ura* d/o-Galaktose-Medium erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie am cLSM 510 Meta (Zeiss). 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 μm. average: 8, pinhole (543 nm): 204 μm, pinhole (488 nm): 240 μm, Laser 543 nm: 9,1 %, Laser 488 nm: 10,1 %.

Wie die Fluoreszenzmikroskopie von YOL062cGFPclone [pRS316 Erd2-mCherry] zeigte, bildete die GFP-Fluoreszenz von Apm4p punktuelle Strukturen im Zellrandbereich. Diese konnten endozytotischen Bereichen zugeordnet werden (Carroll *et al.*, 2009). Das Fluoreszenzmuster von Erd2-mCherry wich stark von Erd2-GFP ab: Es konnten keine distinkten punktuellen Strukturen detektiert werden, sondern lediglich eine inhomogene Fluoreszenz der gesamten Zelle. Dieses Ergebnis konnte auch durch Variation der Kulturbedingungen und des Expressionsvektors nicht verbessert werden. Die starke Hintergrundfluoreszenz schien die Erd2-spezifische Fluoreszenz zu überdecken und erlaubte keine Aussage über eine Kolokalisation von Erd2p und der AP-2 Komplex-Untereinheit Apm4p.

Interaktion von Erd2p mit der μ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes

Die Interaktion des AP-2 Komplexes mit einem zu endozytierenden Membranprotein wird durch spezifische Signale vermittelt, welche durch Untereinheiten des Komplexes erkannt werden. Bisher wurden drei Motive beschrieben: YXX \emptyset , [DE]XXXL[LI] und das Di-Isoleucin-Signal II (\emptyset : hydrophobe Aminosäure (Leu, Met, Ile, Phe oder Val), X: beliebige Aminosäure; Traub, 2009). Durch Analyse der Aminosäuresequenz von Erd2p konnte, unter Berücksichtigung der Rezeptor-Topologie, das Motiv YXX \emptyset in einem zytosolischen Loop identifiziert werden. Die Aminosäureabfolge YNEM an Position 90-93 befindet sich zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne.

Dieses Motiv wurde erstmals als Internalisierungssignal des Transferrin-Rezeptors beschrieben. Eine effiziente Endozytose konnte nur beobachtet werden, wenn das Motiv mindestens sieben Aminosäurereste von der zytosolischen Seite der Plasmamembran entfernt war (Collawn *et al.*, 1990). Diese Bedingung ist auch bei Erd2p erfüllt, da jeweils genau sieben Aminosäurereste zwischen der YNEM-Sequenz und den Transmembrandomänen liegen (Abb. 67).

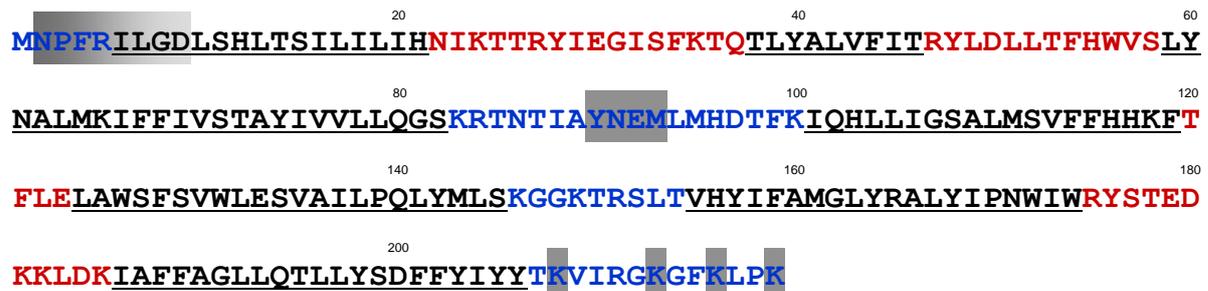


Abb. 67: Erd2p-Aminosäuresequenz mit potentiellen Endozytose-Motiven. Nach dem Topologie-Modell des HDEL-Rezeptors ist die Aminosäuresequenz in Transmembrandomänen (schwarz unterstrichen), zytosolische (blau), nicht-zytosolische (rot) Bereiche eingeteilt (Dausend, 2010). Potentielle Endozytose-Motive sind grau hervorgehoben.

Ohno *et al.* konnten 1995 die Interaktion der μ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes mit dem Endozytose-Signal YXX \emptyset durch ein „yeast two-hybrid“ Assay nachweisen, wobei diese später durch Kristallisationsexperimente detailliert analysiert wurde (Jackson *et al.*, 2010). Eine mögliche Interaktion zwischen dem *S. cerevisiae* Homolog der μ 2-Untereinheit, Apm4p, und dem YNEM-Motiv des K28-Rezeptors Erd2p sollte ebenfalls *in vivo* mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) untersucht werden. Dieses System beruht auf der Rekonstitution eines Fluoreszenzproteins aus zwei nicht-fluoreszierenden Fragmenten, welche mit den zu untersuchenden Interaktionspartnern fusioniert sind. Das mCherry-basierte BiFC-System wurde erstmals von Fan *et al.* (2008) beschrieben und konnte erfolgreich zum Nachweis von Proteininteraktionen in *S. cerevisiae* etabliert werden (Schäuble, 2008). mCherry wurde zwischen den Aminosäuren 159 und 160 in zwei Fragmente (MN und MC) geteilt, die über eine Linker-Sequenz mit den potentiellen Interaktionspartnern verbunden waren. Durch diese flexible Verbindung wird die Faltung der Fusionsproteine erleichtert, so dass die Funktion der Fänger- und Beuteproteine erhalten bleiben und die Rekonstitution des Fluoreszenzproteins ermöglicht wird (Kerppola, 2006). Apm4p wurde am N- oder C-Terminus mit einem mCherry-Fragment (MC bzw. MN) fusioniert, wohingegen Erd2p nur C-terminal mit einem mCherry-Fragment verbunden wurde. Diese Lokalisierung wurde gewählt, da Erd2p als Transmembranprotein sehr sensitiv auf Veränderungen des N-Terminus reagiert, wobei Fusionen am C-Terminus die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigten (Dausend, 2010). Die verschiedenen

Variationen wurden getestet, da für jeden individuellen Fall die optimale Kombination der Fusionsproteine empirisch ermittelt werden muss (Sung & Huh, 2007). Zur Expression der Beute- und Fängerproteine wurden diese durch *Sall*/*Paul*- (*APM4*) oder *Sall*/*Xho*/*Xba*-Restriktion (*ERD2*) in die BiFC-Vektoren (Schäuble, 2008) eingebracht, so dass sie jeweils über einen Linker mit einem mCherry-Fragment fusioniert wurden. Die Expression wurde durch einen Galaktose-induzierbaren Promotor gesteuert. Tab. 20 gibt einen Überblick über die hergestellten *ERD2*- und *APM4*-Fusionen.

Tab. 20: Vektoren des BiFC-Systems zur Analyse einer *Apm4p*-*Erd2p*-Interaktion in *S. cerevisiae*. Die Beute- und Fängerkonstrukte wurden jeweils durch eine flexible Linker-Sequenz am N-Terminus (n) oder C-Terminus (c) mit dem N-terminalen (MN) oder C-terminalen (MC) mCherry-Fragment verbunden.

<i>ERD2</i>	<i>APM4</i>
pRS316 MCc Erd2 	pRS315 MNc Apm4 
pRS316 MCc Erd2 	pRS315 MNn Apm4 
pRS315 MNc Erd2 	pRS136 MCc Apm4 
pRS315 MNc Erd2 	pRS316 MCn Apm4 

Wie bei allen Anwendungen, in denen Fusionsproteine zum Einsatz kommen, wurde zunächst deren Funktionalität überprüft. Dazu wurde die K28-Sensitivität einer Δ *apm4*-Deletionsmutante nach Expression der *Apm4*-Fusionen im Agardiffusionstest bestimmt. Im Vergleich zu den Negativkontrollen, den BiFC-Vektoren pRS315 MCc und pRS315 MNc, führte die Expression der *Apm4p*-Varianten zu einer deutlich ausgeprägten K28-Sensitivität, was auf eine wildtypische Funktionsfähigkeit der *Apm4p*-Fusionen schließen lässt. Die Funktionalität einer *Erd2p*-Variante, die C-terminal mit einem mCherry-Fragment versehen war, konnte bereits bestätigt werden (Dausend, 2010).

Die Fänger- und Beutekonstrukte wurden jeweils, wie Tab. 20 zu entnehmen, in die wildtypische Hefe BY4742 eingebracht und die Koexpression durch zweitägige Inkubation in Galaktose-haltigem leu ura d/o-Medium bei 20 °C induziert. Die niedrige Temperatur führt zu einer effizienteren Faltung von Fluoreszenzproteinen (Tsien, 1998). Um die Interaktion zwischen der μ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes, *Apm4p*, und dem K28-Rezeptor *Erd2p*

zu forcieren, wurden die Zellen in Vorbereitung zur Fluoreszenzmikroskopie 2 h mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert. Die Rekonstitution des Fluorophors mCherry zum Nachweis einer Interaktion der beiden Proteine wurde am konfokalen Laserscanning Mikroskop überprüft (Abb. 68).

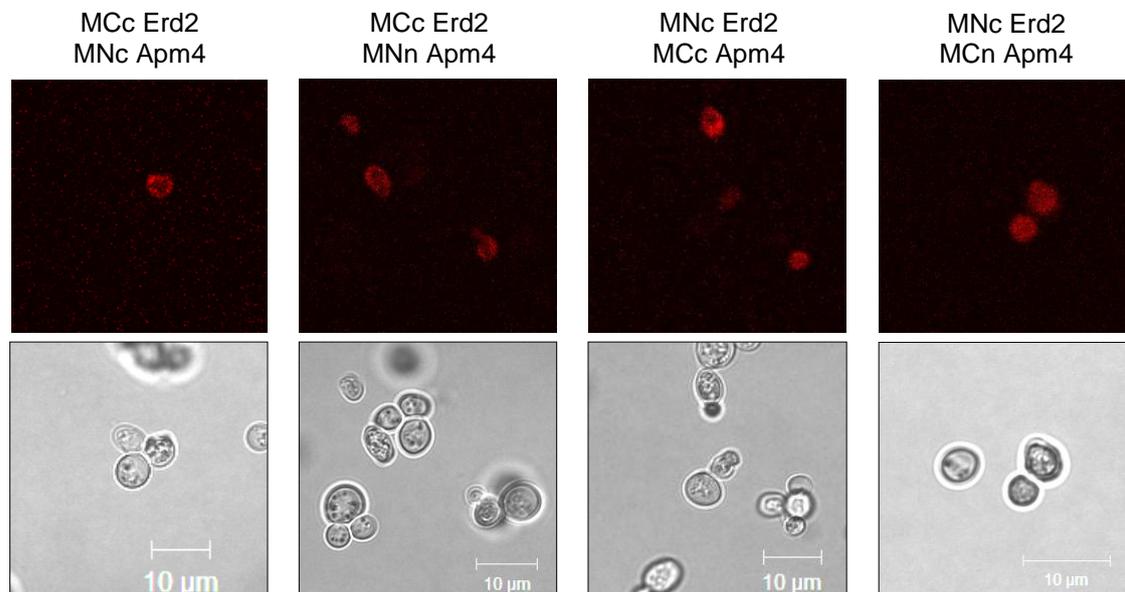


Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse einer Erd2p-Apm4p Interaktion im BiFC-System. *S. cerevisiae* BY4742 wurde nach Koexpression von MCc Erd2/MNc Erd2 und MNc Apm4/MNn Apm4/MCc Apm4/MCn Apm4 2 h bei 20 °C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert und die Rekonstitution des Fluorophors mCherry am konfokalen Laserscanning Mikroskop (cLSM 510 Meta, Zeiss) untersucht. 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 µm. average: 4, pinhole: 248 µm, Laser 514 nm: 4,1 %.

Alle vier möglichen Kombinationen aus Beute- und Fängerkonstrukten führten zu einer schwachen Fluoreszenz einzelner Zellen, wobei besonders weniger vital aussehende Hefezellen stark fluoreszierten. Dieses Phänomen war teilweise auch bei der Negativkontrolle MCc/MNc zu beobachten (Abb. 69). Die Fluoreszenz war zudem deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Positivkontrolle MCc Sis1 bzw. MNc Sis1. Das Hsp40 Co-Chaperon Sis1p bildet Homodimere und wurde daher sowohl in YFP- als auch in mCherry-basierten BiFC-Systemen als Positivkontrolle verwendet (Sha *et al.*, 2000; Sung & Huh, 2007; Schäuble, 2008).

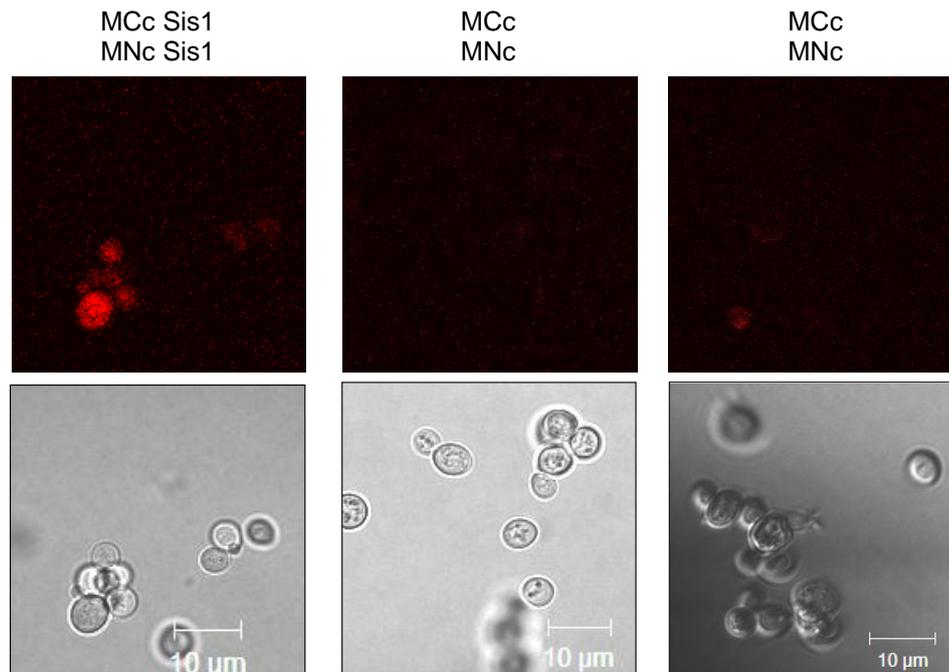


Abb. 69: Fluoreszenzmikroskopie der Positiv- und Negativkontrollen des BiFC-Systems. *S. cerevisiae* BY4742 [pRS316 MCc/pRS315 MNc] und S86c [pRS316 MCc Sis1/pRS315 MNc Sis1] wurden nach 2 d Kultivierung in Galaktose-haltigem leu ura d/o-Medium bei 20 °C mit K28-Toxinkonzentrat inkubiert (2 h bei 20 °C) und die Rekonstitution des Fluorophors mCherry am konfokalen Laserscanning Mikroskop (cLSM 510 Meta, Zeiss) untersucht. 100fache Vergrößerung, Messbalken: 10 µm. average: 4, pinhole: 248 µm, Laser 514 nm: 4,1 %.

Da die Interaktion zwischen der AP-2 Komplex Untereinheit $\mu 2$ und dem HDEL-Rezeptor Erd2p auch nach Inkubation mit dem Erd2p Liganden K28 nicht eindeutig im BiFC-System nachweisbar war, wurde die Bedeutung des Erd2p eigenen YXXØ-Motivs für die K28-Endozytose untersucht. Durch gezielte Mutation der YNEM-Sequenz sollte die Bindung von Apm4p an den Rezeptor unterbunden werden, wodurch die Rezeptor-Endozytose und damit die K28-Internalisierung beeinträchtigt wären.

Collawn *et al.* (1990) identifizierten das YXXØ-Motiv, wozu sie durch gezielten Aminosäure-Austausch eine Serie an mutierten Transferrin-Rezeptoren generierten. Die Mutation der YTRF-Sequenz zu ATRA führte zur einer um 85 % reduzierten Eisenaufnahme, womit dieser Aminosäureaustausch den stärksten inhibierenden Effekt hatte. Daher wurde das Erd2p-eigene YNEM-Motiv zu ANEA mutiert. Dazu wurde die Intron-freie *ERD2*-Gensequenz mittels SOE-PCR amplifiziert, so dass die Mutation im SOE-Primerbereich erfolgte. In den 5'- und 3'-Primern waren Restriktionsschnittstellen enthalten, so dass das Konstrukt nach Sequenzierung durch *EcoRI/SalI*-Restriktion in den Vektor pRS316 Erd2.657 Reporter im Bereich der Expressionskassette eingebracht werden konnte. Diese Kassetten wurde einschließlich des Galaktose-induzierbaren Promotors durch *ApaI/SacI*-Restriktion in den Vektor pESC-LEU kloniert. Analog zur Vorgehensweise unter Punkt 3.4.2.2 wurde die Δ *erd2*-Deletionsmutante YA12 mit dem Vektor pESC-LEU Erd2 ANEA transformiert und einer FOA-Selektion unterzogen. Nach Verlust des Plasmids pYA12 (2µ,

URA3, ADE3, SEC12) ermöglichte die Expression der mutierten Erd2p-Variante Erd2 ANEA das Zellwachstum. Folglich blieb die Funktionalität des Rezeptors auch nach Mutation des YXXØ-Motivs erhalten. Um die Auswirkung dieser Mutation auf die Rezeptor-Endozytose und damit die K28-Internalisierung zu untersuchen, wurde die K28-Sensitivität von YA [pESC-LEU Erd2 ANEA] im Agardiffusionstest bestimmt (Abb. 70). Wie schon unter Punkt 3.4.2.2 dargestellt, wurden aufgrund von starken Wachstumsunterschieden mehrere Klone getestet und die Mittelwerte berechnet. Im Vergleich zum Wildtyp YA [pESC-LEU Erd2] konnte kein eindeutiger Unterschied im Hemmhofdurchmesser festgestellt werden.

Die Ergebnisse konnten eine Interaktion der μ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes mit dem K28-Rezeptor Erd2p nicht eindeutig belegen: Die Mutation des Apm4p-Interaktionsmotivs YXXØ in der Erd2p-Sequenz hatte keinen signifikanten Effekt auf die Toxinaufnahme. Eine direkte Interaktion des Rezeptors mit dem AP-2 Komplex konnte im BiFC-Assay nicht klar bestätigt werden.

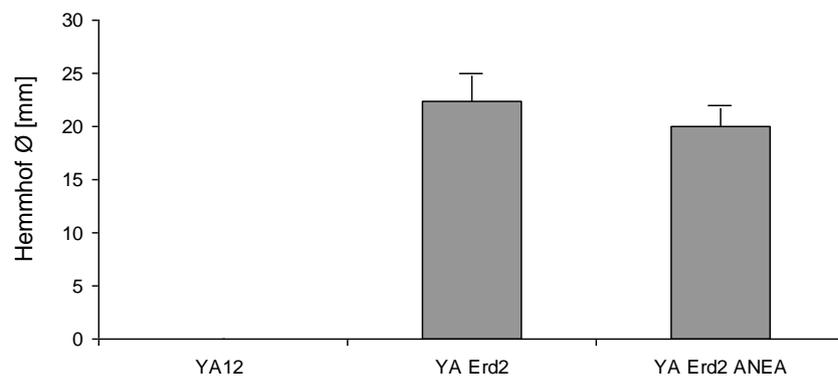


Abb. 70: K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* nach Expression von Erd2p-Varianten: Einfluss des Erd2p-eigenen YNEM-Motivs. 1×10^6 Zellen von *S. cerevisiae* YA12 (Δ *erd2*), YA [pESC-leu Erd2] oder YA [pESC-leu Erd2 ANEA] wurden in Minimal-Methylenblau-Galaktose-Agar eingebettet, 100 μ l K28-Toxinkonzentrat (10fach) in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 - 10 d Inkubation bei 20 °C bestimmt. Aufgrund von starken Wachstumsunterschieden wurden fünf Klone getestet, die Mittelwerte der Hemmhofgrößen gebildet und die Standardabweichung angegeben.

3.4.4. Analyse der K28-Rezeptormobilität

Die Analyse der Erd2p-Mobilität stellt eine sensitive Methode zur Charakterisierung der Beteiligung von endozytotischen Proteinen an der Erd2p-Endozytose dar. Wie unter Punkt 3.4.3.2 beschrieben, führte die Deletion von *END3* zu einer signifikanten Verminderung der Erd2p-Mobilität. In Hefe- wie in Säugerzellen hat die Bestimmung der Dynamik endozytotischer Proteine entscheidend dazu beigetragen, den zeitlichen Ablauf der Endozytose analysieren zu können (Kaksonen *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2011). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Mobilität des K28-Rezeptors unter verschiedenen

Bedingungen bestimmt werden, was eine detaillierte Beschreibung der Toxin-Endozytose, auch im Hinblick auf die Dynamik dieses Prozesses, ermöglichen würde. Die zur Mobilitätsanalyse eingesetzte Methode wurde von Nofal *et al.* (2007) entwickelt: Sie basiert auf der Bestimmung des CD, einem quantitativen Maß für die Dynamik der Vesikelmobilität. Alle Versuche wurden mit einer GFP-markierten Erd2p-Rezeptor-Variante durchgeführt, deren biologische Aktivität bereits nachgewiesen wurde (Dausend, 2010). Erd2-GFP wurde im Centromervektor pRS316 unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors P_{GAL1} exprimiert.

3.4.4.1. Einfluss von K28 auf die Erd2p-Mobilität

Zunächst wurde untersucht, ob das Vorhandensein eines Liganden einen Einfluss auf die Rezeptormobilität ausübt. Die Endozytose des Modell-Cargo α -Faktor wurde bereits eingehend analysiert, wobei festgestellt wurde, dass die Internalisierung des α -Faktor Rezeptors Ste2p konstitutiv stattfindet. Durch Zugabe des Liganden kann sie um das Zehnfache gesteigert werden (Schandel & Jenness, 1994). Ob die Inkubation mit K28 ebenfalls die Internalisierungsrate des HDEL-Rezeptors Erd2p erhöht, war bisher nicht bekannt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Erd2-GFP exprimierenden Hefezellen zeigten nach Inkubation mit K28 keine Veränderungen im Vergleich zur Pufferkontrolle. Allerdings konnte eine Inkubation mit Toxinkonzentrat die im BiFC-Assay visualisierte Interaktion des Rezeptors Erd2p mit der Ubiquitin-Ligase Rsp5p verstärken (Dausend, 2010). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das Vorhandensein des Liganden K28 einen Einfluss auf die Mobilität des Rezeptors Erd2p ausübt.

Dazu wurde BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] unter induzierenden Bedingungen bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und 30 min bei 20 °C mit K28-Toxinkonzentrat (1 : 2,6 verdünnt in Inkubationspuffer ohne Sorbitol) inkubiert. Die TIRF-Mikroskopie sowie die anschließende Auswertung der Aufnahmen wurden wie unter Punkt 3.4.2.2 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden jeweils 180 Zellen analysiert. Verglichen wurde jeweils die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD, normiert auf deren Gesamtzahl. Wie Abb. 71 zu entnehmen ist, hatte die Inkubation mit K28 keinen Einfluss auf die Erd2p-Mobilität; die Häufigkeitsverteilung der CD zeigte keinen Unterschied zwischen K28-Inkubation und Pufferkontrolle. Auch die Analyse der Bewegung in z-Richtung sowie die Bestimmung der Erd2-GFP-Verweildauer bestätigten dieses Ergebnis: Ein Einfluss von K28 auf die Erd2p-Mobilität konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

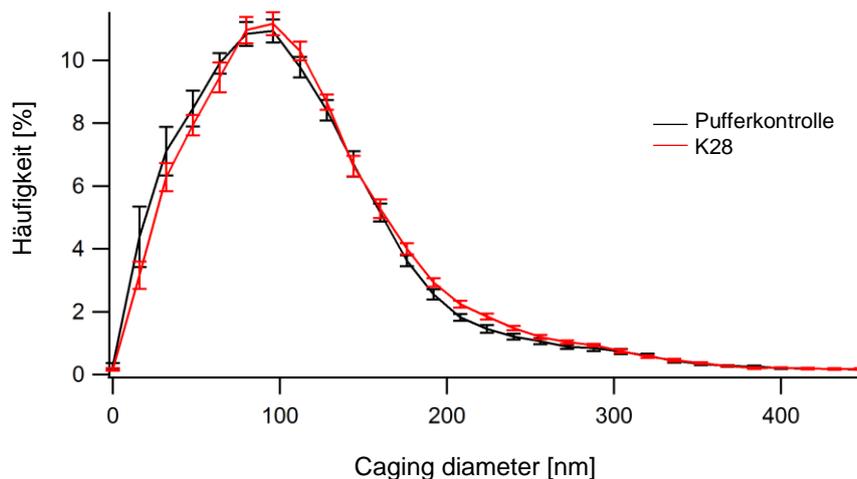


Abb. 71: Einfluss von K28 auf die Erd2-GFP-Mobilität durch Bestimmung des „caging diameter“. BY4742 [pRS316 Erd2-GFP] wurde in Galaktose-haltigem ura d/o Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Nach 30 min Inkubation mit K28-Toxinkonzentrat (200fach; 1 : 2,6 in Inkubationspuffer verdünnt) wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2 min, 10 Hz) an einem TIRF-Mikroskop durchgeführt. Nach einem Tracking („Easy Track“) konnte der „caging diameter“ (CD) als Maß für die Mobilität in x,y-Richtung bestimmt werden (Nofal *et al.*, 2007). Dargestellt ist die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD-Werte, normiert auf deren Gesamtzahl sowie der Standardfehler des Mittelwerts ($N_{\text{individuelle Messungen}} = 15$, $n = 180$ Zellen).

3.4.4.2. Einfluss von Chc1p, Sac6p und Rvs167p auf die Erd2p-Mobilität

Um eine detaillierte Charakterisierung der K28-Endozytose durchführen zu können, sollte die Erd2p-Mobilität unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden. Dazu wurden Deletionsmutanten ausgewählt, welche in bestimmten Internalisierungsschritten Defekte aufweisen. Die Deletion der „clathrin heavy chain“ ($\Delta chc1$) führt zu einer Reduktion der Endozytose-Stellen sowie zu einer Delokalisierung endozytotischer Proteine. Clathrin gehört zu den ersten Proteinen, welche an Endozytose-Stellen erscheinen; es ist verantwortlich für die Bildung einer Hülle um gebildete Vesikel. Rvs167p ist als Bestandteil des Amphiphysin-Moduls zu einem späteren Schritt an der Vesikelabschnürung beteiligt, welche durch Deletion von *RVS167* verhindert wird. Des Weiteren wurde die Auswirkung der Deletion von *SAC6* auf die Erd2p-Mobilität untersucht. Sac6p ist ein Bestandteil des später gebildeten Aktin-Moduls und sorgt für die Quervernetzung der Aktinfilamente, was zur Kraftübertragung bei der Vesikelinternalisierung notwendig ist. $\Delta sac6$ Zellen weisen schwere Defekte in der Struktur des Aktinnetzwerks auf (Kaksonen *et al.*, 2005; Toret & Drubin, 2006).

Da Deletionen dieser endozytotischen Proteine schwere Auswirkungen auf den Ablauf der Endozytose hervorrufen, sollten sie auch die Erd2p-Mobilität beeinflussen. Daher wurde zunächst die K28-Sensitivität der Deletionsmutanten im Agardiffusionstest bestimmt, was erste Hinweise auf Defekte in der Toxin-Internalisierung ergeben sollte (Abb. 72).

Verglichen mit dem isogenen Wildtyp führte die Deletion von *CHC1* zu einer verminderten K28-Sensitivität. Zudem war das Wachstum der Deletionsmutante stark verlangsamt und nicht mit dem Wildtyp zu vergleichen. *Δrvs167* zeigte ebenfalls eine verminderte K28-Sensitivität; wohingegen die Deletion von *SAC6* eine vollständige Toxinresistenz bewirkt.

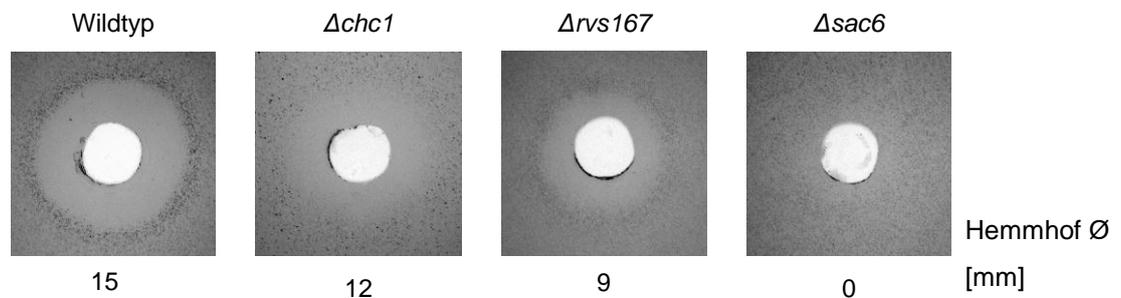


Abb. 72: Agardiffusionstest zur Bestimmung der K28-Sensitivität von *Δchc1*-, *Δsac6*- und *Δrvs167*-Deletionsmutanten. 1×10^6 Zellen des wildtypischen Hefestamms *S. cerevisiae* BY4742 sowie der entsprechenden Deletionsmutanten wurden in SC-Glucose-MBA eingebettet, 100 μ l K28-Toxinkonzentrat (200fach) in ein ausgestanztes Loch gefüllt und der Hemmhofdurchmesser nach 3 d Inkubation bei 20 °C bestimmt.

Da alle zu untersuchenden Deletionsmutanten eine zumindest verringerte Toxinsensitivität aufwiesen, wurden sie zur weiteren Analyse mit pRS316 Erd2-GFP transformiert und die Lokalisation des Rezeptors mittels TIRF-Mikroskopie bestimmt (Abb. 73 und Abb. 74). Das Fluoreszenzmuster von *Δrvs167* und *Δsac6* zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp. Über die Zelle verteilt konnte eine punktförmige Fluoreszenz beobachtet werden, welche Rezeptoren zuzuordnen ist, die im Zellrandbereich oder der Plasmamembran lokalisiert sind. Nur diese Deckglas-nahen Strukturen können im TIRF-Mikroskop visualisiert werden.

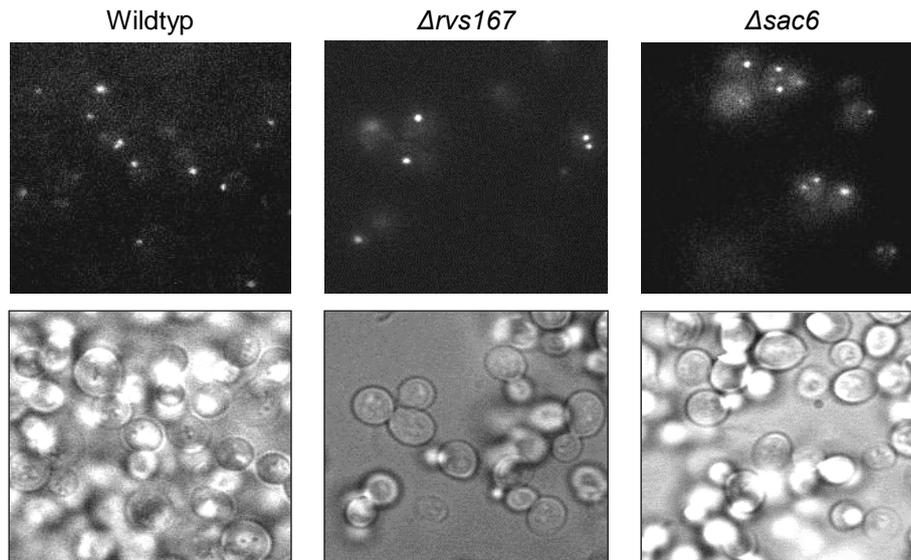


Abb. 73: TIRF-Mikroskopie von Erd2-GFP in $\Delta sac6$ - und $\Delta rvs167$ -Deletionsmutanten. BY4742, $\Delta sac6$ und $\Delta rvs167$ wurden mit pRS316 Erd2-GFP transformiert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert. Dargestellt sind die GFP-Fluoreszenz sowie die Hellfeldaufnahmen. TIRF-Mikroskop: Quant EM Kamera, 100x/1.45 NA Plan Apochromat TIRF Objektiv, TILL-TIRF Kondensator, multi-line Argon Laser 1885F12, 488 nm.

Die Deletion von *CHC1* führte zu einem vollständigen Verlust der Erd2-GFP Signale in TIRF (Abb. 74). Wie die Epifluoreszenz-Aufnahme zeigte, war durchaus Erd2-GFP-Fluoreszenz vorhanden, welche punktförmige Signale über die Zelle verteilt generierte. Wurde der Winkel des Anregungslichtes über den kritischen Winkel hinaus vergrößert und damit die Totalreflektion ausgelöst, konnte keine Fluoreszenz mehr detektiert werden. Folglich waren keine Erd2-GFP Vesikel im Zellrandbereich oder an der Plasmamembran lokalisiert; eine Beobachtung, die bereits für die Endozytose-Proteine Sla1-GFP und Las17-GFP in einer Clathrin-Mutante beschrieben wurde (Kaksonen *et al.*, 2005).

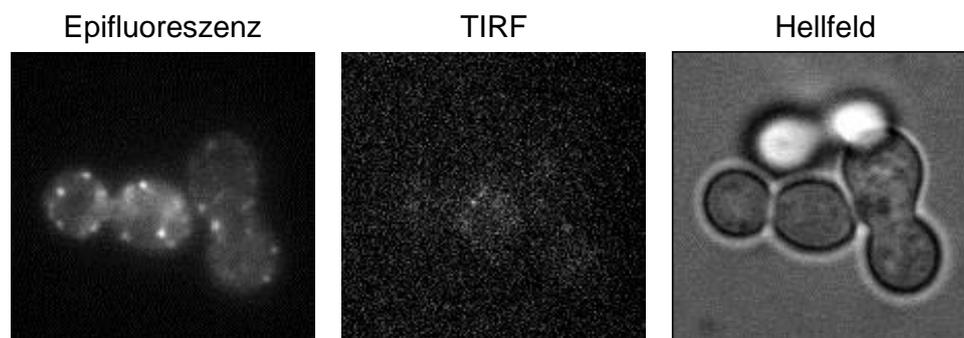


Abb. 74: Fluoreszenzmikroskopie von Erd2-GFP in einer $\Delta chc1$ -Deletionsmutante. *S. cerevisiae* $\Delta chc1$ wurde mit pRS316 Erd2-GFP transformiert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert. Dargestellt sind die GFP-Epifluoreszenz, TIRF sowie die Hellfeldaufnahme. Mikroskop: Quant EM Kamera, 100x/1.45 NA Plan Apochromat TIRF Objektiv, TILL-TIRF Kondensator, multi-line Argon Laser 1885F12, 488 nm

Die Analyse der Erd2p-Mobilität beschränkte sich daher auf die Deletionsmutanten $\Delta rvs167$ und $\Delta sac6$ und wurde wie unter Punkt 3.4.2.2 durchgeführt. Anhand der TIRF-Aufnahmen von 150 Zellen (2 min, 10 Hz) und dem Tracking der Erd2-GFP Bewegung wurden die CD-Werte berechnet. Deren durchschnittliche Häufigkeitsverteilung, normiert auf die Gesamtzahl, ist in Abb. 75 dargestellt. Der Vergleich mit dem Wildtyp BY4742 ergab, dass die Deletion von $SAC6$ oder $RVS167$ die Erd2p-Mobilität nicht beeinflusst. Abweichungen im Kurvenverlauf liegen innerhalb des Standardfehlers des Mittelwerts und deuten nicht auf eine Veränderung der Erd2p-Beweglichkeit hin. Demzufolge hatte nur die Deletion der schweren Clathrin-Kette einen nachweisbaren Einfluss auf die Lokalisation des K28-Rezeptor Erd2p; sie führte zu einer starken Verminderung der Kolo­kalisierung des Rezeptors an der Zelloberfläche bzw. der Plasmamembran. Die Rezeptormobilität blieb allerdings bei Defekten in der Vesikelabschnürung ($\Delta rvs167$) oder des Aktinnetzwerkes ($\Delta sac6$) in vollem Umfang erhalten, soweit dies mit den angewendeten Methoden detektiert werden konnte. Zusammenfassend korrelieren die Ergebnisse der Erd2p-Mobilitätsanalyse nicht immer mit der Toxinsensitivität: Nur die Deletion von $END3$ (Punkt 3.4.3.2) oder $CHC1$ veränderte die Beweglichkeit bzw. die Lokalisation des HDEL-Rezeptors, was vermutlich auch unter anderem die reduzierte K28-Sensitivität bedingt. Die verminderte Toxinsensitivität von $\Delta rvs167$ und die K28-Resistenz von $\Delta sac6$ sind wahrscheinlich auf Defekte der Endozytose zurückzuführen, die keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Erd2p-Beweglichkeit oder -Lokalisation haben.

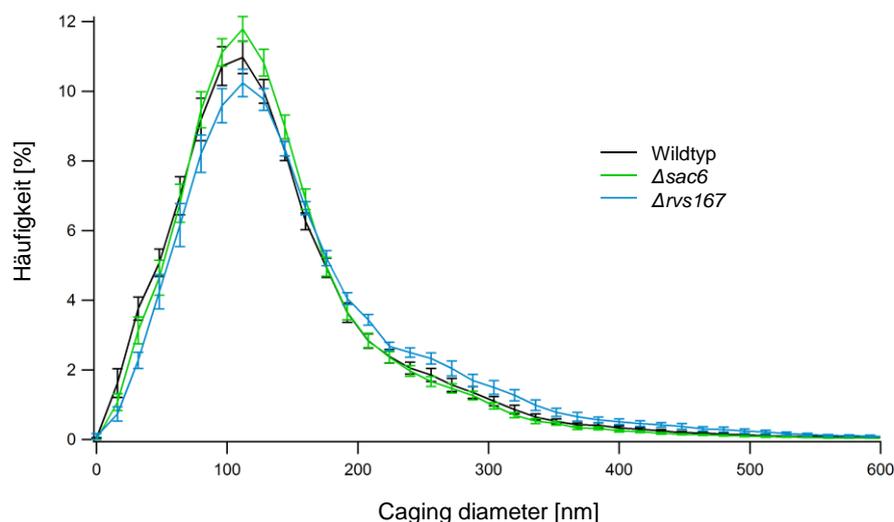


Abb. 75: Analyse der Erd2-GFP Mobilität in $\Delta rvs167$ - und $\Delta sac6$ -Deletionsmutanten. *S. cerevisiae* BY4742, $\Delta sac6$ und $\Delta rvs167$ wurden mit pRS316 Erd2-GFP transformiert und in Galaktose-haltigem ura d/o Medium zur Induktion der Proteinexpression kultiviert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2 min, 10 Hz) wurden an einem TIRF-Mikroskop durchgeführt. Nach einem Tracking („Easy Track“) konnte der „caging diameter“ (CD) als Maß für die Mobilität in x,y-Richtung bestimmt werden (Nofal *et al.*, 2007). Dargestellt ist die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der CD-Werte, normiert auf deren Gesamtzahl sowie der Standardfehler des Mittelwerts ($N_{\text{individuelle Messungen}} = 15$, $n = 150$ Zellen).

4. Diskussion

Bakterielle Proteintoxine zählen zu den stärksten bekannten Giften, die selbst in geringer Konzentration eine große toxische Wirkung aufweisen. Dazu gehört auch das potenteste natürlich vorkommende Toxin, das Botulinum-Toxin, produziert von *Clostridium botulinum*, welches bereits in einer Dosierung von 0,003 µg intravenös appliziert, tödlich auf einen erwachsenen Menschen wirkt. Im Vergleich dazu ist das Alkaloid Strychnin erst ab einer Menge von 15 mg letal. Allerdings findet das Botulinum-Toxin auch Anwendung in der Medizin, beispielsweise bei der Therapie von fokalen Dystonien. Um einerseits von Proteintoxinen profitieren zu können und andererseits Intoxikationen entgegenzuwirken, ist die genaue Kenntnis der Toxinaufnahme und -wirkung unerlässlich. Das Botulinum-Toxin ist ein Mitglied der A/B-Toxin-Familie, die sich durch einen charakteristischen strukturellen Aufbau auszeichnet. Die A-Untereinheit besitzt enzymatische Aktivität und modifiziert spezifisch Zielproteine, sobald sie das Zytosol der Säugerzelle erreicht. Die B-Untereinheit hingegen vermittelt die Toxinbindung an Zelloberflächenrezeptoren und teils auch den intrazellulären Transport. Die meisten Toxine werden durch Endozytose internalisiert und erreichen das Zytosol durch Translokation aus Endosomen oder dem ER. Die katalytisch aktive A-Untereinheit kann beispielsweise als ADP-Ribosyltransferase den Elongationsfaktor 2 inaktivieren oder als N-Glykosylase die 28S rRNA depurinieren und somit die Proteinbiosynthese hemmen (Falnes & Sandvig, 2000; Iglewski *et al.*, 1977; Endo & Tsurugi, 1988).

Neben Bakterien und Pflanzen sind auch Hefen in der Lage, Toxine zu produzieren, die ebenfalls antimikrobielle Aktivität aufweisen (Polonelli *et al.*, 1991; Polonelli & Morace, 1986). Während die meisten dieser Proteintoxine auf Ebene der Plasmamembran wirken und deren Integrität zerstören, lösen Toxine von *Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae* oder *Debaryomyces hansenii* einen Zellzyklus-Arrest aus (Magliani *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 1991; Klassen *et al.*, 2004). Das viral kodierte Killertoxin K28, welches von *Saccharomyces cerevisiae* sezerniert wird, verursacht das gleiche Phänomen, einen Arrest in der frühen S-Phase des Zellzyklus (Schmitt *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1996).

Bisher ist K28 das einzige bekannte Killertoxin, welches durch Endozytose aufgenommen und retrograd in der Zielzelle transportiert wird (Eisfeld *et al.*, 2000). Auch die strukturelle Organisation dieses Proteintoxins entspricht derjenigen von A/B-Toxinen, wobei die β -Untereinheit für die Rezeptor-Erkennung und den intrazellulären Transport verantwortlich ist und durch eine Disulfidbrücke mit der α -Untereinheit verbunden ist, die vermutlich im Zellkern ihre toxische Wirkung entfaltet (Riffer *et al.*, 2002; Spindler, 2004). Die Toxinaufnahme durch eine sensitive Hefezelle läuft in zwei Schritten ab: Zunächst bindet K28 an den Primärrezeptor, ein α -1,3-Mannoprotein der Hefezellwand (Schmitt & Radler, 1987). Für die Interaktion mit dem Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran ist das HDEL-Motiv notwendig,

welches am C-Terminus der β -Untereinheit lokalisiert ist (Eisfeld *et al.*, 2000; Spindler, 2004). Das Signal-Peptid wurde auch bei löslichen ER-Proteinen nachgewiesen; in Säugerzellen lautet es KDEL (Pelham *et al.*, 1988; Munro & Pelham, 1987). Diese Proteine enthalten posttranslationale Modifikationen, welche im Golgi-Apparat erworben wurden, was auf eine Rezeptor-vermittelte Rückführung in das ER schließen lässt (Pelham, 1988). Erst durch einen genetischen Screen in *S. cerevisiae* gelang es, die Gene *ERD1* und *ERD2* zu identifizieren, welche für die Retention von HDEL-markierten Proteinen notwendig sind (Semenza *et al.*, 1990). Erd1p scheint eine korrekte Interaktion des HDEL-Rezeptors Erd2p mit seinen Liganden zu gewährleisten (Hardwick *et al.*, 1990). Der HDEL-Rezeptor ist ein Protein von 26 kDa mit mehreren Transmembrandomänen, dessen N- und C-Termini im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Funktion des Proteins ist essentiell, bereits eine verringerte Kopienzahl führt zu Beeinträchtigungen des Golgi-Apparats (Semenza *et al.*, 1990).

Ein Rückhaltemechanismus für ER-residente Proteine konnte in einer Vielzahl von Spezies identifiziert werden, wobei deren Signale variieren können. In Pflanzen werden vornehmlich K/H/RDEL-Motive erkannt, in der Hefe *Kluyveromyces lactis* vermittelt das DDEL-Signal die ER-Retention (Napier *et al.*, 1992; Denecke *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1990). Die drei KDEL-Rezeptoren von Säugerzellen weisen unterschiedliche Spezifitäten auf und können eine Vielzahl von KDEL-Variationen erkennen, darunter HDEL, REEL oder PGEL (Raykhel *et al.*, 2007; Gande *et al.*, 2008). Der KDEL-Rezeptor aus *Arabidopsis thaliana* kann sogar eine *ERD2*-Deletion in *S. cerevisiae* komplementieren, wohingegen ein KDEL-Rezeptor aus Säugerzellen die Sekretion von KDEL-markierten Proteinen in *S. cerevisiae* nicht verhindern konnte (Lee *et al.*, 1993; Lewis & Pelham, 1990). Der Mechanismus der ER-Retention nutzt den pH-Gradienten zwischen dem neutralen ER und dem Golgi, wo ein saurer pH-Wert herrscht und die Bindung zwischen HDEL-Rezeptor und Liganden stattfindet. Nach dem Transport durch COP-I-Vesikel wird der Ligand im ER entlassen und Erd2p gelangt zurück zum Golgi (Wilson *et al.*, 1993).

K28 bindet bereits auf Ebene der Plasmamembran der Hefezelle an den HDEL-Rezeptor, der dort vermutlich in geringer Kopienzahl kolokalisiert, und erreicht nach endozytotischer Aufnahme des Rezeptor/Liganden-Komplexes das endosomale Kompartiment (Eisfeld *et al.*, 2000; Dausend, 2010). Ebenso wie bei der Endozytose zahlreicher Permeasen, scheint auch bei der Internalisierung von Erd2p die Rezeptorubiquitinierung eine entscheidende Rolle zu spielen (Lauwers *et al.*, 2010; Heiligenstein *et al.*, 2006; Dausend, 2010). Der weitere retrograde Toxintransport über Golgi und ER läuft entsprechend dem bekannten ER-Retentionsmechanismus, vermittelt durch den HDEL-Rezeptor (Eisfeld *et al.*, 2000). Die bakteriellen Toxine *Pseudomonas* Exotoxin A, Cholera-Toxin und das *E. coli* Hitze-labile Toxin besitzen ebenfalls KDEL-ähnliche Erkennungsmotive und können daher durch Interaktion mit dem KDEL-Rezeptor das ER der Säugerzelle erreichen (Jackson *et al.*, 1999; Lencer *et al.*,

1995; Girod *et al.*, 1999; McKenzie *et al.*, 2009). Durch Retrotranslokation gelangt das K28-Heterodimer in das Zytosol, wo nach Reduktion der Disulfidbrücke die β -Untereinheit ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird, wohingegen K28 α vermutlich nach Diffusion in den Nukleus einen Zellzyklus-Arrest auslöst (Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1996).

Die Analyse der A/B-Toxin-Internalisierung und des intrazellulären Transports stützt sich größtenteils auf fluoreszenzmikroskopische Methoden, die eine Visualisierung des Toxin-Traffickings in der lebenden Zelle ermöglichen (Majoul *et al.*, 2004). Dabei können sowohl das Toxin selbst, welches extern appliziert wird, als auch der Toxinrezeptor fluoreszenzmarkiert sein. Die Ergebnisse erlauben auch Rückschlüsse über den Ablauf von essentiellen zellulären Prozessen wie der ER-Retrotranslokation oder der Endozytose (Sandvig & van Deurs, 2005; Watson *et al.*, 2005). Gerade zur Untersuchung der Endozytose in Hefezellen hat der Einsatz von Chimären aus Rezeptoren und Fluoreszenzproteinen entscheidend beigetragen (Kelm *et al.*, 2004; Toshima *et al.*, 2009). Jedoch steht nur eine geringe Anzahl an fluoreszenzmarkierten Cargo-Proteinen zur Verfügung, welche eine eindeutige Unterscheidung der endozytotischen und biosynthetischen Kompartimente und eine Darstellung der Endozytose im Zeitverlauf ermöglichen (Toshima *et al.*, 2006).

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Visualisierung der K28-Aufnahme und des intrazellulären Transports, was die Produktion von biologisch aktivem fluoreszierendem Killertoxin voraussetzte. Parallel konnte unter anderem durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten HDEL-Rezeptorvariante die Plasmamembranlokalisierung und Endozytose des K28-Rezeptors Erd2p bestätigt werden, so dass deren Ablauf und die beteiligten Komponenten charakterisiert werden konnten.

Herstellung fluoreszenzmarkierter K28-Varianten

Die Grundlage für eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der K28-Endozytose und des retrograden Toxintransports ist die Produktion fluoreszenzmarkierter Toxinvarianten. Die Technik der Fluoreszenzmikroskopie hat sich seit der Konstruktion des ersten Fluoreszenzmikroskops Anfang des 20. Jahrhunderts zu einem der wichtigsten Werkzeuge der naturwissenschaftlichen und medizinischen Forschung entwickelt. Anfangs wurden hauptsächlich kleine organische Fluorophore eingesetzt, welche an Antikörper oder direkt an das Protein von Interesse gekoppelt wurden (Haugland, 1995). Mit einer Größe von unter 1 kDa und nach einer industriellen Optimierung hinsichtlich der Helligkeit und Photostabilität sind sie für ein breites Anwendungsspektrum geeignet (Giepmans *et al.*, 2006). Die ersten Versuche zur Kopplung des Cholera-Toxins mit einem organischen Fluorophor, einem

Sulfoindocyanin, führten zu fluoreszenzmarkierten B-Untereinheiten, welche die Untersuchung des retrograden Toxintransports in Verozellen ermöglichten (Majoul *et al.*, 1996). Zwei Jahre später konnten Mallard *et al.* (1998) die Internalisierung des Shiga-Toxin B-Fragments, gekoppelt mit einem Fluorophor, im Zeitverlauf verfolgen und eine Kinetik erstellen. Auch zur Mikroskopie von Hefezellen wurden Liganden mit organischen Farbstoffen gekoppelt; das Pheromon α -Faktor wurde dazu mit einem Alexa Fluor-Derivat fusioniert und dessen endozytotische Aufnahme durch *S. cerevisiae* bestimmt (Bajaj *et al.*, 2004; Toshima *et al.*, 2006; Toshima *et al.*, 2009; Mathew *et al.*, 2011).

Neben den organischen Fluorophoren werden zunehmend Quantum dots (QDs) zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. Dabei handelt es sich um anorganische Nanokristalle, deren Fluoreszenzwellenlänge von ihrer Größe abhängt und welche hohe Extinktionskoeffizienten sowie eine gute Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen. Sie besitzen meist einen Cadmiumselenid- oder Cadmiumtellurid-Kern und eine Zinksulfid-Hülle. Die Entwicklung sogenannter „coatings“ ermöglichte die Konjugation mit Antikörpern oder Streptavidin und damit eine biologische Anwendung (Michalet *et al.*, 2005; Pinaud *et al.*, 2006). Ein Nachteil ist jedoch die Größe der QDs, welche in Verbindung mit Biomolekülen 10 bis 30 nm betragen kann (Giepmans *et al.*, 2006). Die erste Kopplung von QDs an eine A/B-Toxin-Untereinheit zielte eher auf eine Markierung der gesamten Zelle ab; der intrazelluläre Transport der B-Untereinheit des Cholera-Toxins war nicht Gegenstand der Untersuchung (Chakraborty *et al.*, 2007). Tekle *et al.* analysierten das Trafficking des pflanzlichen Toxins Ricin, des Shiga-Toxins sowie des Liganden Transferrin, welche mit QDs fusioniert waren. Letzterer akkumulierte in den Endosomen, da das Recycling blockiert war. Ebenso unterblieb der Transport der Shiga-Toxin und Ricin-B-Untereinheiten zum Golgi-Apparat, woraus geschlossen werden kann, dass QDs die Physiologie der Zelle stark beeinflussen (Tekle *et al.*, 2008).

Eine Grundlage für eine erfolgreiche Konjugation von A/B-Toxinen mit Fluorophoren ist die Herstellung von reinem Toxin in größerem Maßstab. Des Weiteren sollten die Bedingungen der Kopplungsreaktion hinsichtlich des pH-Werts und des Redoxmilieus nicht zu einer Inaktivierung des Toxins führen. Diese Voraussetzungen waren jedoch bei dem viralen Killertoxin K28 nicht erfüllt. Selbst durch verschiedenste Chromatographie-Techniken gelang es in der vorliegenden Arbeit nicht, wildtypisches K28-Toxin Konzentrat vollständig zu reinigen (Daten nicht gezeigt). Auch ist die Auswahl an Fluorophoren, deren Kopplungsreaktion im sauren Milieu und damit im Bereich des pH-Optimums von K28 (siehe unten) stattfinden kann, sehr gering. Daher wurde das Toxin in dieser Arbeit auf genetischer Ebene mit einem Fluorophor fusioniert.

Der prominenteste Vertreter der Fluoreszenzproteine, das grün fluoreszierende Protein (GFP), wurde 1962 erstmals aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura *et al.*, 1962). Erst mehr als 30 Jahre später gelang es, das Gen zu klonieren und GFP zur Proteinlokalisierung in lebenden Zellen zu nutzen (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994). Wie alle bisher entdeckten Fluoreszenzproteine, die eine ähnliche zylindrische Struktur besitzen, besteht GFP aus einem elfsträngigen β -Barrel, das eine zentrale α -Helix umgibt, die das Fluorophor enthält, und kurzen helikalen Segmenten, welche die Enden des Zylinders schützen (Ormö *et al.*, 1996; Remington, 2006; Yarbrough *et al.*, 2001; Shaner *et al.*, 2007). Zur Fluoreszenz sind bis auf Sauerstoff keine Kofaktoren nötig, da das Fluorophor durch spontane Zyklisierung und Oxidation von drei Aminosäuren gebildet wird (Niwa *et al.*, 1996; Tsien, 1998). Zur Expression in Hefe wurde eine codonoptimierte Variante, das „yeast enhanced GFP“ (yEGFP), entwickelt, die durch Einführung von zwei Mutationen zudem eine höhere Fluoreszenzintensität erreicht (Cormack *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, 1997).

Die ersten rot fluoreszierenden Proteine wurden 1999 aus Anthozoen isoliert und ebenfalls optimiert, so dass die Bildung von Oligomeren verhindert und die Fluoreszenzeigenschaften sowie die Stabilität verbessert wurden (Matz *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2002; Shaner *et al.*, 2004). Dazu zählt mCherry aus *Discosoma sp.*, ein Derivat des tetrameren DsRed bzw. des monomeren mRFP, was sich aufgrund der hohen Photostabilität besonders für das „live cell imaging“ über einen größeren Zeitraum eignet. Außerdem ist es sehr säurestabil und sowohl N- als auch C-terminal fusionierbar, ohne dass es zu einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten kommt (Shaner *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2005). Auch zeigen die Absorptions- und Emissionsspektren von mCherry und GFP weniger Überlappungen, so dass beide Proteine simultan zu Kollokalisationsstudien verwendet werden können (Shaner *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2006). Neben yEGFP und mCherry wurde noch ein drittes Protein zur Fusion mit K28 gewählt. mTFP („monomeric teal fluorescent protein“), eines der hellsten und photostabilsten Fluoreszenzproteine, ist die monomere Variante des tetrameren CFP („cyan fluorescent protein“) aus der Koralle *Clavularia* (Ai *et al.*, 2006).

Zur Expression einzelner fluoreszenzmarkierter A/B-Toxin-Untereinheiten wird vorwiegend das *E. coli* Expressionssystem genutzt, da es sich größtenteils um bakterielle Toxine handelt. Entscheidend ist die Überprüfung der biologischen Aktivität der Toxinchimären, da diese durch die Fusion mit den Fluoreszenzproteinen von ca. 27 kDa beeinträchtigt sein kann. So konnten der Letal-Faktor und der Ödem-Faktor des Anthrax-Toxins, die A-Untereinheit von Ricin sowie das C-Fragment des Tetanus-Toxins mit GFP oder mCherry fusioniert in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aus dem Zelllysat gereinigt werden. Die enzymatische Aktivität blieb weitgehend erhalten; auch das Trafficking in der Zielzelle schien nicht stark beeinträchtigt zu sein (Zornetta *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006; Kissa *et al.*, 2002).

Dieses System wurde bereits zur Expression von K28-GFP-Fusionen verwendet, was allerdings zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Toxins und des Fluoreszenzproteins führte. Auch einzelne K28-Untereinheiten, fusioniert mit GFP, konnten fluoreszenzmikroskopisch nicht in der Zielzelle visualisiert werden. Des Weiteren führte deren Expression in *E. coli* zur Bildung von Proteinaggregaten („inclusion bodies“), deren Auflösung und Renaturierung ebenfalls zu einem Verlust der biologischen Aktivität beitrugen (Spindler, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte daher K28 in möglichst nativer Form exprimiert werden, was die Expression in Hefen implizierte, da nur in einem eukaryotischen Organismus die notwendigen posttranslationalen Modifikationen und eine korrekte Faltung des Proteins gewährleistet sind. Dies kommt dem natürlichen Killerphänomen sehr nahe, das auf der Sekretion des Toxins durch Hefezellen in das Kulturmedium basiert. Durch die Sekretion wird ein Zellaufschluss überflüssig und die Reinigung der Toxinvarianten deutlich vereinfacht. Auch die Lokalisation des Fluoreszenzproteins innerhalb des Toxinmoleküls wurde gegenüber Spindler verändert, so dass es an den C-Terminus der β -Untereinheit fusioniert ist und C-terminal ein HDEL-Signal trägt. Somit konnte die Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit entsprechend dem wildtypischen Toxin gebildet werden. Auch ist eine Fusion an den N-Terminus des Fluoreszenzproteins zu bevorzugen, da dies einen weniger störenden Effekt auf dessen biologische Aktivität ausübt. Diese Strategie wurde auch zur erfolgreichen subzellulären Lokalisation von 75 % des Hefe-Proteoms als GFP-Fusionen angewendet (Huh *et al.*, 2003). Eine Markierung der K28 α -Untereinheit mit einem Fluoreszenzprotein wurde vermieden, da bereits das Anfügen kleiner Peptidsequenzen wie ein HA- oder V5-Tag an verschiedenen Positionen zu einem Aktivitätsverlust führten (Reiter, 2004; Müller, persönliche Mitteilung). Da der Fokus dieser Arbeit auf der Visualisierung der Endozytose und des retrograden Toxintransports lag, konnte auf eine Fluoreszenzmarkierung der K28 α -Untereinheit verzichtet werden, da diese erst nach der ER-Retrotranslokation im Zytosol von der β -Untereinheit getrennt wird.

Die Sekretion der K28-mCherry und -GFP-Varianten konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl nach Expression in *K. lactis* als auch in *P. pastoris* nachgewiesen werden. Beide Hefegattungen werden auch in industriellem Maßstab zur heterologen Proteinexpression eingesetzt (Ooyen *et al.*, 2006; Bollok *et al.*, 2009). *P. pastoris* dient beispielsweise der Herstellung Antikörper-basierter Therapeutika; außerdem konnte bereits 1991 das C-Fragment des Tetanus-Toxins zur Entwicklung von Spaltvakzinen in der Hefe exprimiert werden (Sharma *et al.*, 2005; Tolner *et al.*, 2007; Romanos *et al.*, 1991a/b). Auch *K. lactis* kann zur Herstellung von Proteinen mit therapeutischem Hintergrund, wie Interleukin-1 β , humanes Serumalbumin oder dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen, verwendet werden (Fleer *et al.*, 1991; Blondeau *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1992). Eine effiziente Sekretion wird bei Bedarf meist durch das Sekretionssignal des *S. cerevisiae* α -Faktors sichergestellt (Romanos *et al.*, 1992; Hitzeman *et*

al., 1990; Bracke *et al.*, 1990; Murasugi & Tohma-Aiba, 2001; Cereghino & Cregg, 2001). Sowohl *K. lactis* als auch *P. pastoris* sekretieren nur geringe Mengen an endogenen Proteinen, was die Isolierung heterolog sezernierter Proteine aus dem Kulturüberstand erleichtert (Dominguez *et al.*, 1998; Bergquist *et al.*, 2002; Cereghino & Cregg, 2000).

In dieser Arbeit konnte eine korrekte Prozessierung der K28-Varianten in ER und Golgi einschließlich der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen α und β mCherry/ β GFP bei der Expression in beiden Hefegattungen bestätigt werden, wobei das Anfügen des Fluoreszenzproteins von ca. 27 kDa keine Beeinträchtigung darstellte. Wildtypisches K28-Toxin wurde bereits in biologisch aktiver und korrekt prozessierter Form nach Expression in *K. lactis* und *P. pastoris* erhalten (Walch, 2006; Eiden-Plach *et al.*, 2004). Die dazu notwendigen Enzyme scheinen daher in beiden Hefen exprimiert zu werden. Das *K. lactis* Homolog zur Endoprotease Kex2p aus *S. cerevisiae*, Kex1p, ist in der Lage eine *kex2*-Mutante der Bäckerhefe zu komplementieren und wurde vor dem Hintergrund der Killertoxinprozessierung in *K. lactis* erstmals beschrieben (Wesolowski-Louvel *et al.*, 1988; Tanguy-Rougeau *et al.*, 1988). Obwohl das *K. lactis* Homolog zur Carboxypeptidase Kex1p aus *S. cerevisiae* noch nicht identifiziert wurde, ist die Milchhefe in der Lage, biologisch aktives wildtypisches K28 zu sezernieren (Walch, 2006; Guida, 2007). Für *P. pastoris* hingegen sind Homologe sowohl zur Endopeptidase Kex2p als auch zur Carboxypeptidase Kex1p aus *S. cerevisiae* bekannt. Zudem stellt die Bildung von Disulfidbrücken kein Problem dar, auch Proteine mit einem hohen Gehalt an Disulfidbindungen wurden erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert (Martinez-Ruiz *et al.*, 1998; Boehm *et al.*, 1999; White *et al.*, 1994).

Hinsichtlich der Fluoreszenz der mCherry-Toxinchimären konnte die Expression im Schüttelkolben in dieser Arbeit optimiert werden: Die Zugabe von „casaminoacids“ zeigte einen positiven Effekt auf die Proteinsekretion von *K. lactis*, möglicherweise durch Stabilisierung des pH-Wertes im neutralen Bereich und Abfangen der sezernierten Proteasen (Merico *et al.*, 2004; Clare *et al.*, 1991; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Ebenso wie bei der Kultivierung von *P. pastoris* konnte durch Addition von Protease-Inhibitor die Proteinausbeute erhöht werden (Shi *et al.*, 2003). Die Kultivierungstemperatur wurde aufgrund der Temperatursensitivität von K28 niedrig gehalten, was zudem die Sekretion heterologer Proteine verbessern kann (Spindler, 2004; Li *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2002). Zur Sekretion von Fluoreszenzproteinen konnte das *P. pastoris*-Expressionssystem bereits erfolgreich eingesetzt werden. Verschiedene GFP-Fusionen, darunter eine GFP-Interleukin-2-Chimäre wurden im Kulturüberstand quantifiziert (Tang *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2005).

Die biologische Aktivität des K28-Toxins in Fusion mit einem Fluoreszenzprotein wurde in der vorliegenden Arbeit erst nach Kultivierung eines Toxin-produzierenden *P. pastoris*-Stamms im Bioreaktor nachgewiesen. Die Sekretion von biologisch aktiven K28-Chimären konnte in *K. lactis* nicht erreicht werden. Obwohl diese Hefe auch zur heterologen Proteinproduktion in

großem Maßstab eingesetzt wird und die Kenntnis der Physiologie weit fortgeschritten ist, überwiegt deutlich die Anzahl an Proteinen, welche in *P. pastoris* exprimiert werden konnten. Auch wenn die Physiologie von *P. pastoris* weniger intensiv erforscht wurde, so unterliegt doch die heterologe Proteinproduktion einer ständigen Optimierung hinsichtlich der Medien-Zusammensetzung, der Kultur- und Induktionsbedingungen (Dominguez *et al.*, 1998; Jahic *et al.*, 2003; Celik *et al.*, 2009). Humanes Insulin, das wie das virale Killertoxin K28 im Sekretionsweg prozessiert wird, konnte ebenfalls durch das Sekretionssignal des α -Mating-Faktors in *P. pastoris* heterolog exprimiert und sezerniert werden, wobei Mengen von 1,5 g/l bei einer OD₆₀₀ von über 500 durch Kultivierung im Fermenter erreicht wurden (Wang *et al.*, 2001). Die Kultivierung von *P. pastoris* im Bioreaktor hat entscheidende Vorteile, wozu die Überwachung und Regulierung des pH-Wertes, des Sauerstoffeintrags und der Zugabe einer Kohlenstoffquelle wie Glycerin oder Methanol zählen (Cereghino *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). Nach dem in dieser Arbeit angewendeten und von Tolner *et al.* (2006) beschriebenen Fermentationsprotokoll konnten ohne weitere Optimierung Proteine entsprechend dem GMP-Standard („good manufacturing practice“) für Klinische Studien der Phase I/II hergestellt und auch das Killertoxin Zygocin aus *Zygosaccharomyces bailii* in *P. pastoris* exprimiert werden (Mayer *et al.*, 2006; Tolner *et al.*, 2007; Lind, 2010).

Zur Produktion von fluoreszenzmarkierten K28-Varianten in *P. pastoris* im Bioreaktor musste jedoch in dieser Arbeit das Protokoll angepasst werden, so dass biologisch aktive, d. h. fluoreszierende und toxische K28-Chimäre hergestellt werden konnten. Bei der Kultivierung im Bioreaktor musste daher ein hoher Sauerstoffeintrag vermieden werden. Killertoxine sind sehr Sauerstoff-sensitiv (Lee & Hassan, 1987); zudem kann eine hohe Sauerstoffkonzentration zu Zellstress und damit der Freisetzung von Proteasen führen (Tolner *et al.*, 2006). Hypoxische Kulturbedingungen können zudem einen positiven Effekt auf die Sekretion rekombinanter Proteine durch *P. pastoris* ausüben (Baumann *et al.*, 2008, 2010). Auch die Temperatur während der Methanol-induzierten Proteinexpression wurde auf 20 °C gesenkt, was dem Temperaturoptimum des Killertoxins entspricht (Spindler, 2004). Die Sekretion von Antikörper-Fragmenten durch *P. pastoris* konnte ebenfalls durch eine Reduktion der Temperatur um 15 °C zum Zeitpunkt der Induktion deutlich gesteigert werden, nachdem die Hefen zuvor bei 30 °C zum Erreichen einer hohen Zelldichte inkubiert wurden (Shi *et al.*, 2003). Wie bereits beschrieben, trägt die Reduktion der Kultivierungstemperatur auch im Allgemeinen zur Verbesserung der heterologen Proteinproduktion und -sekretion bei (Blackwell & Horgan, 1991; Li *et al.*, 2001; Dragosits *et al.*, 2009). Zudem begünstigen niedrige Temperaturen die Faltung von Fluoreszenzproteinen wie GFP (Lim *et al.*, 1995).

Neben einer niedrigen Temperatur und einer konstanten Überwachung des Sauerstoffgehalts ermöglicht die Kultivierung der Toxin-produzierenden Hefe *P. pastoris* im Bioreaktor die genaue Dosierung der Kohlenstoffquelle. Ein Nachteil der Expression heterologer Proteine in

P. pastoris unter Kontrolle des Methanol-induzierbaren AOX1-Promotors ist die Notwendigkeit, während der Kultivierung zu einem bestimmten Zeitpunkt diese Kohlenstoffquelle zu wechseln, da zunächst Glycerin zur Vergrößerung der Biomasse dem Medium kontinuierlich zugeführt wird (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Tolner *et al.*, 2006). Dieser Übergang muss unter kontrollierten Bedingungen stattfinden, da Methanol in hohen Konzentrationen toxisch wirkt (Substrattoxizität). Eine plötzliche Erhöhung der Methanolkonzentration kann zur Entstehung toxischer Intermediate des Methanol-Katabolismus wie Formaldehyd oder Wasserstoffperoxid führen (Swartz & Cooney, 1981; Stratton *et al.*, 1998). Durch die genau dosierbare und kontinuierliche Zugabe von Methanol wird während der Kultivierung im Bioreaktor eine Fluktuation der Methanolkonzentration vermieden, was bei der manuellen Methanoldosierung bei einer Kultivierung im Schüttelkolben nicht möglich ist (Mayson *et al.*, 2003). Wird die Methanolzugabe als wachstumsbegrenzender Faktor eingesetzt und die Wachstumsrate dadurch reduziert, nimmt auch der proteolytische Abbau heterolog exprimierter Proteine deutlich ab, wie am Beispiel der Sekretion von Hirudin durch *P. pastoris* gezeigt wurde (Zhou & Zhang, 2002). Eine niedrige Wachstumsrate ist bei der K28-Toxinherstellung zu bevorzugen, da bei geringen Zelldichten auch weniger Sauerstoff benötigt wird und so auf eine Erhöhung der Rührrate oder die Zugabe von reinem Sauerstoff verzichtet werden kann; ein wichtiger Faktor bei der Herstellung von Sauerstoff-sensitivem Killertoxin.

Abgesehen von der Wachstumsrate kann auch der pH-Wert des Kulturmediums die Produktion des Fremdproteins stark beeinflussen. So konnte durch konstante Überwachung des pH-Werts das Enzym Galaktose-Oxidase aus *Dactylium dendroides* in *P. pastoris* exprimiert werden, welches bereits bei pH-Werten unter 6 instabil vorliegt (Whittaker & Whittaker, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Dieser Vorteil des Fermentationsprozesses hat auch in der vorliegenden Arbeit entscheidend zur Expression von biologisch aktivem Killertoxin beigetragen, da im Schüttelkolben das pH-Optimum von K28 nicht konstant gehalten werden konnte.

Die Killeraktivität von K28 nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Bereits ab einem pH-Wert von 5,8 war eine verminderte Aktivität festzustellen, welche bei pH 6 nicht mehr nachweisbar war. Die anschließende Überführung in einen Puffer mit optimalem pH-Wert konnte die Inaktivierung nicht aufheben; es handelt sich somit um einen irreversiblen Prozess (Sehn, 2005; Spindler, 2004). Auch andere Killertoxine wie K1 aus *S. cerevisiae*, Zygocin aus *Z. bailii* oder PMKT2 aus *Pichia membranifaciens* zeigen eine starke pH-Abhängigkeit und können ihre toxische Wirkung nur in einer sauren Umgebung entfalten (Kurzweilova & Sigler, 1993; Weiler & Schmitt, 2003; Santos *et al.*, 2009). Dieses Phänomen ist auf das natürliche Habitat der Killerhefen zurückzuführen, die ein Viertel der aus Früchten isolierten Hefestämme ausmachen; eine Umgebung, in der ein niedriger pH-Wert herrscht (Starmer *et al.*, 1987; Magliani *et al.*, 1997). Untersuchungen an Sphäroplasten haben ergeben, dass sich die pH-

Abhängigkeit von K28 vermutlich nicht nur auf die Zellwandbindung zurückführen lässt, da sich Sphäroplasten bei einem neutralen pH-Wert ebenfalls K28-resistent verhielten (siehe unten). Durch Zellfraktionierungsstudien Toxin-behandelter Sphäroplasten konnte Spindler schließlich belegen, dass bei neutralen Bedingungen zwar eine, wenn auch verminderte Toxinaufnahme, stattfindet, das Toxin jedoch vollständig zur Vakuole dirigiert wird (Spindler, 2004). Ein saurer pH-Wert dagegen erlaubt auch die Bindung an den K28-Membranrezeptor Erd2p und damit eine spezifische, Rezeptor-vermittelte Endozytose im Gegensatz zur unspezifischen Aufnahme durch „fluid phase“ Endozytose, die in einem vakuolären Toxintransport resultiert. Obwohl die „fluid phase“ Endozytose bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert verstärkt zu beobachten ist, scheint bei sauren Bedingungen auch die Rezeptor-vermittelte Endozytose zur K28-Internalisierung beizutragen, denn nur auf diesem Weg erreicht das Toxin sein Zielkompartiment (Motizuki *et al.*, 2008).

Die Ligandenbindung des HDEL-Rezeptor Erd2p wird durch den pH-Wert bestimmt: Wilson *et al.* konnten *in vitro* belegen, dass radioaktiv-markierte KDEL-ähnliche Peptide an Golgi-Membranen oder Membranpräparationen aus COS-Zellen, welche den KDEL-Rezeptor enthalten, pH-abhängig binden. In einem Bereich von pH 5 bis 5,5 konnte die stärkste Bindung verzeichnet werden (Wilson *et al.*, 1993). Dies bedingt die Bindung von Erd2p-Liganden an den Rezeptor im Golgi, wo ein saurer pH herrscht, und die Entlassung der K/HDEL-Proteine im neutralen ER (Anderson & Pathak, 1985; Schwartz *et al.*, 1985; Mellman *et al.*, 1986). Der pH-Wert abhängige Mechanismus der Rezeptor/Liganden-Bindung ist ein verbreitetes Phänomen, das bei zahlreichen Prozessen beschrieben wurde. Dazu zählt beispielsweise die Interaktion des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors mit seinen Liganden, Mannose-6-Phosphat-markierte saure Hydrolasen, welche in endosomale Kompartimente transportiert werden (von Figura & Hasilik, 1986; Hille-Rehfeld, 1995; Olson *et al.*, 2008). Auch der LDL-Rezeptor („low density lipoprotein“) bindet seinen Liganden pH-abhängig an der Zelloberfläche und entlässt ihn im sauren Endosom, so dass der Rezeptor recycelt und das Lipoprotein zu den Lysosomen transportiert werden kann (Brown & Goldstein, 1986; Yamamoto *et al.*, 2008).

Vor diesem Hintergrund scheint die pH-Abhängigkeit der K28-Toxizität auf die Wechselwirkung mit dem Sekundärrezeptor an der Plasmamembran, dem HDEL-Rezeptor, zurückzuführen sein, welche nur in saurem Milieu stattfinden kann. Diese Interaktion ermöglicht die spezifische K28-Internalisierung und den retrograden intrazellulären Transport bis in das Zytosol, so dass das Toxin den Zellkern erreichen und seine toxische Wirkung entfalten kann. Der pH-Wert beeinflusst jedoch auch die Aktivität der Fluoreszenzproteine der Toxinchimären und wurde daher zur Toxinproduktion in dieser Arbeit in einem möglichst schwach sauren Bereich gewählt, der dennoch die Killeraktivität des Toxinanteils nicht zu stark beeinträchtigt.

Die Isolierung der biologisch aktiven K28-Chimären aus dem *P. pastoris*-Fermenterüberstand wurde exemplarisch mit K28-mCherry^{HDEL} getestet. Nach einer Umpufferung durch Gelfiltrationschromatographie wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, welche zu einer fast vollständigen Reinigung des Fusionsproteins führte; jedoch kam es aufgrund der verwendeten Puffer zu einem Verlust der Killeraktivität. Umgekehrt gelang durch eine Anionenaustauschchromatographie von K28-mCherry^{HDEL} mit Toxin-spezifischem Puffer keine Reinigung der K28-Chimäre. Comitini *et al.* erreichten allerdings unter diesen Bedingungen eine gute Isolierung des KpKt Killertoxins nach Fermentation von *Kluyveromyces phaffii* (Comitini *et al.*, 2004). Das wildtypische Killertoxin K28 konnte bisher lediglich mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt werden; eine Methode, die aufgrund der sauren Pufferbedingungen nicht in Kombination mit einem Fluoreszenzprotein angewendet werden kann (Schmitt & Radler; 1987). Zur Reinigung von Fluoreszenzproteinen wie DsRed oder monomerem DsRed wird die Eigenschaft dieser Proteine, Kupfer zu binden, genutzt, so dass durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Kupferionen eine mehr als 95%ige Reinigung von DsRed aus *E. coli*-Lysat erzielt werden konnte (Rahimi *et al.*, 2007). Allerdings wurde diese Methode bisher nicht zur Isolierung von mCherry beschrieben; zudem schließen die dazu notwendigen alkalischen pH-Bedingungen eine Reinigung von biologisch aktivem K28-mCherry^{HDEL} aus.

P. pastoris sekretiert nur geringe Mengen endogener Proteine; der Anteil eines heterolog exprimierten Proteins kann daher über 80 % der Gesamtproteinmenge im Kulturmedium betragen (Tschopp *et al.*, 1987; Cereghino & Cregg, 2000; Jha *et al.*, 2007). Da die Kultivierung zudem in einer Protein-freien Mineral-Salz-Lösung stattfand (Tolner *et al.*, 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit nach der Umpufferung der Toxinvarianten auf eine weitere Reinigung verzichtet. Zur Inkubation mit Hefezellen genügt die Umpufferung des Toxinkonzentrates. Allerdings wären für Inkubationsexperimente mit Säugerzellen gereinigte Toxinchimäre vorzuziehen, wobei der Fokus dieser Arbeit nicht auf der Untersuchung einer toxischen Wirkung von K28 auf höhere eukaryotische Zellen, sondern auf der Visualisierung der Toxinaufnahme lag.

Die Variation der Fluoreszenz, welche zwischen den mCherry- und GFP-Fusionen mit dem Killertoxin K28 festgestellt wurde, kann auf die pH-Sensitivität der Fluorophore zurückgeführt werden, da die Kultivierung im Bioreaktor und auch die anschließende Umpufferung bei einem pH von 5,3 stattfand. Dabei zeigten mCherry-Fusionen die stärkste Fluoreszenz, gefolgt von mTFP. K28-GFP-Chimäre waren kaum fluoreszent, was durch die Sensitivität gegenüber einer sauren Umgebung bedingt sein kann (Doherty *et al.*, 2010). mCherry ist mit einem pK_a-Wert von < 4,5 eines der säurestabilsten Fluoreszenzproteine (Shaner *et al.*, 2004). Der pK_a-Wert von mTFP von 4,3 deutet ebenfalls auf ein relativ Säure-unempfindliches Protein hin (Ai *et al.*, 2006; Shaner *et al.*, 2007). Die Fluoreszenz von GFP (pK_a 6) hingegen nimmt mit sinkendem

pH-Wert stark ab; bereits bei einem pH von 5,5 wurde eine Reduktion der Fluoreszenz um 50 % festgestellt. Die pH-Sensitivität wird vermutlich durch Protonierung des Chromophors und Konformationsänderungen bedingt (Patterson *et al.*, 1997; Kneen *et al.*, 1998; Tsien, 1998; Haupts *et al.*, 1998; Shaner *et al.*, 2005). Dennoch konnten Campbell und Choy biologisch aktives GFP auch im Citrat-gepufferten Medium (pH 5,5) einer *P. pastoris*-Kultur nachweisen (Campbell & Choy, 2002).

Die Bildung von stark fluoreszierenden Proteinaggregaten konnte in der vorliegenden Arbeit vor allem bei K28-mCherry-Varianten beobachtet werden, was eventuell durch eine hohe Konzentration des Fusionsproteins induziert wird und auch die Aktivität der Toxinchimären beeinflussen kann (siehe unten) (Wiedenmann *et al.*, 2009). Die Bildung von Aggregaten bei der heterologen Proteinsekretion durch Fermentation von *P. pastoris* scheint ein extrazellulärer Prozess zu sein, der durch entsprechende Kulturbedingungen wie limitierende Methanolzugabe und damit verbunden einem geringeren Sauerstoffeintrag und verringerter Rührrate reduziert werden kann (Woo *et al.*, 2006); Parameter, die in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Sensitivität des produzierten Toxins bereits so niedrig wie möglich gehalten wurden. Außerdem wurde speziell bei rot fluoreszierenden Proteinen eine Aggregationsneigung festgestellt, die in der Bildung von mikroskopisch sichtbaren Clustern aus präzipitierten Proteinen resultierte. Da die Aggregation nativer Proteine selten vorkommt, sind die Mechanismen dieses Phänomens bisher kaum untersucht (Davidson & Campbell, 2009; Yanushevich *et al.*, 2002; Wetzel, 1994).

Unterschiede in der Fluoreszenzintensität und Killeraktivität können auch durch eine verringerte Menge an heterolog exprimierten Toxininfusionen oder Fluoreszenzproteinen im Kulturüberstand bedingt sein, was bei Vergleich der Bandenstärke im Coomassie-Gel deutlich wird. Dies kann auf eine geringere Sekretion, eine verminderte Proteinstabilität oder eine schwächere Expression zurückgeführt werden. Letztere kann auch mit der Anzahl an Genkopien korrelieren, welche von einer Einfach- oder Mehrfachintegration der Expressionskassette in das Genom von *P. pastoris* bestimmt wird (Clare *et al.*, 1991). Des Weiteren wurden in dieser Arbeit starke Schwankungen zwischen den einzelnen Fermentationen, auch bei Kultivierung des gleichen Toxin-produzierenden Stamms festgestellt, da die Reproduzierbarkeit einer heterologen Proteinexpression in *P. pastoris* nicht immer gegeben ist (Sokalowski, 1998).

Fusionen aus der K28 β -Untereinheit mit einem Fluoreszenzprotein waren bei Expression in *K. lactis* in der Vakuole lokalisiert und wurden nicht sezerniert. Das gleiche Phänomen wurde bei der Expression des entsprechenden *P. pastoris*-Stamms im Bioreaktor beobachtet. Spindler (2004) beschrieb ebenfalls, dass eine GFP- β^{HDEL} -Fusion eine verringerte Löslichkeit besitzt. Bestätigt werden konnte dieses Phänomen durch die Expression von mCherry-Fragmenten, fusioniert an die β -Untereinheit von K28: Weder *K. lactis* noch *P. pastoris*

konnten diese Varianten in das Kulturmedium sezernieren (Dausend, persönliche Mitteilung). Rekombinante Proteine, welche zur Sekretion bestimmt sind, werden häufig zur Vakuole fehlgeleitet. Dies kann durch Wechselwirkung mit VSPs („vacuolar sorting proteins“) im Golgi vermittelt werden. Diese Proteine sind normalerweise an dem Transport nativer vakuolärer Proteine beteiligt, können aber auch das Fehltargeting heterologer Proteine zur Vakuole bedingen (Rakestraw *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2001). Auch GFP, welches durch ein N-terminales Signalpeptid sekretiert werden sollte, wurde in der Vakuole von *S. cerevisiae* lokalisiert (Kunze *et al.*, 1999). In diesem Beispiel konnte durch Ersetzen des Sekretionssignals durch die Prä-Region des viralen Killertoxins K28 eine effiziente Sekretion von GFP in vier Hefegattungen erreicht werden (Eiden-Plach *et al.*, 2004). Auf einen Austausch der α -Mating-Faktor-Signalsequenz wurde in dieser Arbeit bei der Produktion von β -mCherry^{HDEL} verzichtet, da durch Reduktion der Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit im K28-mCherry^{HDEL}-Molekül ebenfalls β -mCherry^{HDEL} erhalten wurde.

Eine toxische Wirkung konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei Toxinchimären nachgewiesen werden, welche das K28 α/β -Heterodimer sowie das C-terminale HDEL-Signal enthielten. Da die α -Untereinheit den enzymatisch aktiven Teil des A/B-Toxins darstellt und für die Auslösung eines Zellzyklus-Arrests in der Zielzelle verantwortlich ist, bedingt sie die Toxizität. Dies wurde durch die intrazelluläre Expression von PräproK28 α oder PräK28 α , jeweils mit C-terminalem Argininrest, bestätigt; die entsprechenden Hefen zeigten nach Induktion der K28 α -Expression einen Selbstkillerphänotyp. Die α -Untereinheit wird dabei zunächst in den Sekretionsweg eingeschleust, kann jedoch auf retrogradem Weg das Zytosol erreichen und in den Nukleus gelangen (Sendzik, 2006; Kelkel, 2009). Der C-terminalen HDEL-Sequenz konnte eine essentielle Funktion bei der Interaktion mit dem Sekundärrezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran und dem retrograden Transport zugeordnet werden: Eine wildtypische K28-Variante ohne C-terminales HDEL-Motiv weist keine Toxizität auf und konnte nicht im Zytosol der Zielzelle nachgewiesen werden (Eisfeld *et al.*, 2000). Auch ermöglichte dieses Signal die Aufnahme und den retrograden Transport von GFP durch sphäroplastierte Hefezellen (Spindler, 2004).

Die biologische Aktivität der fluoreszenzmarkierten K28-Chimären K28-mCherry^{HDEL} und K28-mTFP^{HDEL} war im Vergleich zu wildtypischem Toxin, welches im gleichen *P. pastoris*-Stamm exprimiert wurde, reduziert. Dies ist nicht auf eine verringerte Menge an Toxin im Fermenterüberstand zurückzuführen, wie nach elektrophoretischer Auftrennung und Coomassie-Färbung ersichtlich wurde: Die Proteinmenge an K28-Fusionen überstieg sogar die Menge an wildtypischem K28 deutlich, was durch die oben genannten Ursachen begründet werden kann. Die verminderte Killeraktivität der K28-Chimären ist vielmehr durch das anfusionsierte Fluoreszenzprotein bedingt, welches das Molekulargewicht von K28 um fast das 2,5fache erhöht. Da die Passage durch die Zellwand der Hefezelle mit zunehmendem

Molekulargewicht erschwert wird, könnte durch die Fusion mit einem Fluoreszenzprotein auch die Zellwandüberquerung der K28-Chimären beeinträchtigt werden und die verminderte Toxizität dieser Toxinvariante erklären (de Nobel & Barnett, 1991). Durch die Fusion mit einem Fluoreszenzprotein kann auch die Konformation geändert und damit die Zugänglichkeit der K28-Untereinheiten zu zellulären Interaktionspartnern und Rezeptoren stark beeinträchtigt werden. Das Fluoreszenzprotein ist im K28-Molekül zwischen der β -Untereinheit und dem HDEL-Motiv lokalisiert und ist somit N-terminal mit K28 und C-terminal mit dem HDEL-Motiv verbunden. Fluoreszenzproteine mit einer C-terminalen ER-Zielsteuerungssequenz sind kommerziell erhältlich und werden als Marker zur Darstellung des ER bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt, da aufgrund des funktionellen H/KDEL-Motivs eine Akkumulation im ER stattfindet (Haseloff *et al.*, 1997; Tamura *et al.*, 2004; Pantazaka & Taylor, 2011; Ingmundson & Roy, 2008). Wie bereits beschrieben beeinträchtigen Fusionen an den N-Terminus eines Fluoreszenzproteins im Allgemeinen weniger die Funktion und subzelluläre Lokalisation als am C-Terminus; so basiert ein Großteil der fluoreszenzmikroskopischen Daten zur Endozytose in *S. cerevisiae* auf Fusionsproteinen mit C-terminal angefügtem Fluoreszenzprotein (Huh *et al.*, 2003; Palmer & Freeman, 2004; Kaksonen *et al.*, 2003; Kaksonen *et al.*, 2005; Toret *et al.*, 2008). Dennoch kann in K28-Chimären sowohl die Zugänglichkeit des HDEL-Motivs als auch des K28-Toxins beeinträchtigt sein: Sowohl N- als auch C-Terminus des Fluoreszenzproteins sind auf einer Seite der zylindrischen Struktur lokalisiert, so dass es zwischen daran angefügten Komponenten zu einer gegenseitigen Behinderung kommen kann (Shaner *et al.*, 2007).

Ein Aktivitätsverlust nach Fusion mit einem Fluoreszenzprotein oder organischem Fluorophor wurde auch bei anderen Toxinen beschrieben. So beeinträchtigte die Kopplung des α -Faktors mit einem Fluorophor dessen biologische Aktivität: Die Induktion einer „Mating“-Morphologie in α -Zellen war um das 25- bis 50fache reduziert, verglichen mit wildtypischem α -Faktor (Toshima *et al.*, 2006). Auch die Fusion eines Fluoreszenzproteins an das virale Killertoxin Zygocin resultierte in einem reduzierten Killerphänotyp (Lind, 2010).

Fluoreszenzmarkierte Varianten des Anthrax-Toxins, welches wie K28 zur Familie der A/B-Toxine zählt, zeigten ebenfalls eine verringerte Aktivität. Sowohl der Ödem-Faktor als auch der Letal-Faktor, jeweils fusioniert mit GFP, hatten eine geringere enzymatische Aktivität als unkonjugierte Varianten, was die Autoren auf eine eventuell geringere Anzahl an Fusionstoxinen zurückführten, die in der Lage waren das Zytosol zu erreichen. Dennoch konnten diese Toxinchimären in ihr Zielkompartiment gelangen und daher zur Analyse der Endozytose und des intrazellulären Traffickings beitragen (Zornetta *et al.*, 2010). Das Gleiche gilt für fluoreszenzmarkierte K28-Varianten, die fluoreszieren und eine, wenn auch verminderte, Killeraktivität aufweisen: Sie werden von der Zielzelle aufgenommen und wurden daher zum „live cell imaging“ der K28-Aufnahme eingesetzt.

„Live cell imaging“ der K28-Aufnahme

Um Einblick in die Dynamik zellulärer und subzellulärer Prozesse zu erhalten, ist die Untersuchung lebender Zellen unerlässlich. Durch das „live cell imaging“ konnte erstmals die Proteindynamik in lebenden Zellen in Echtzeit analysiert werden, eine Methode, die mehr und mehr an Bedeutung gewinnt und Erkenntnisse über zelluläre Abläufe von der einzelnen Zelle bis zu deren Funktion im gesamten Organismus liefert (Chamberlain & Hahn, 2000; Watson *et al.*, 2005; Meijering *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu ist die Voraussetzung zur Anwendung Immunfluoreszenz-mikroskopischer Methoden die Fixierung und Permeabilisierung der Zelle. Diese Behandlungen können zur Entstehung von Artefakten und Autofluoreszenz führen, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert (Clancy & Cauller, 1998; Petty, 2007). Deren Qualität korreliert mit der verwendeten Antikörper; das Vorhandensein hochwertiger spezifischer Antikörper ist daher die wichtigste Grundlage der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Giepmans *et al.*, 2006). Im Zeitraum der vorliegenden Arbeit stand kein hinreichend spezifischer Antikörper gegen das Killertoxin K28 zur Verfügung, so dass keine Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von wildtypischem K28 durchgeführt werden konnte. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten jedoch entscheidende Aspekte der A/B-Toxin-Internalisierung aufgeklärt werden. Dazu zählen zum Beispiel die Beteiligung des Zytoskeletts an der Aufnahme des Cholera-Toxins oder die Identifizierung endosomaler Komponenten, die an der Translokation des *Pseudomonas* Exotoxins A beteiligt sind (Streuli *et al.*, 1981; Alami *et al.*, 1998). Immunfluoreszenz-mikroskopische Daten lieferten auch erste Hinweise auf den Transport des Shiga-Toxins zum Golgi-Apparat; die Rolle des Retromer-Komplexes bei diesem Vorgang wurde allerdings erst durch „live cell imaging“ Experimente mit fluoreszenzmarkierten Shiga-Toxin-Untereinheiten bestätigt (Warnier *et al.*, 2006; Popoff *et al.*, 2007).

Die fluoreszenzmarkierte K28-Variante, K28-mCherry^{HDEL}, zeigte sowohl hinsichtlich der Fluoreszenz als auch der Toxizität biologische Aktivität und wurde folglich entsprechend dem wildtypischen Toxin von sensitiven Hefezellen internalisiert und retrograd transportiert. In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis intrazellulärer Toxinmoleküle neben dem Toxizitätstest, auch durch Zellfraktionierungsstudien von K28-mCherry^{HDEL}-behandelten Sphäroplasten erbracht werden. Das Fusionsprotein wurde in allen Fraktionen, einschließlich des Zytosols nachgewiesen, was auf ein mit dem wildtypischen K28 vergleichbares intrazelluläres Trafficking schließen lässt: Nach einer zweistündigen Toxininkubation akkumulierten im Zytosol hauptsächlich die dissoziierten K28-Untereinheiten, so dass β -mCherry^{HDEL} detektiert werden konnte. Unter den reduzierenden Bedingungen im Zytosol wird die Disulfidbindung zwischen der α - und β -Untereinheit gelöst, so dass nur noch eine geringe Menge des heterodimern Toxins, in der vorliegenden Arbeit K28-mCherry^{HDEL}, in undissoziierter Form vorhanden ist (Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein *et al.*, 2006).

Zellfraktionierungsstudien von Toxin-behandelten Zellen erlauben Rückschlüsse über die Toxin-Internalisierung und den intrazellulären Transport. Die subzelluläre Fraktionierung von Säugerzellen nach Inkubation mit radioaktiv-markiertem Shiga-Toxin lieferte Hinweise auf einen Toxintransport zum Golgi-Apparat und den Einfluss der Zellpolarisation auf die Toxin-Internalisierung (Sandvig *et al.*, 1991). Auch die Endozytose und der intrazelluläre Transport von weiteren bakteriellen und pflanzlichen A/B-Toxinen wie dem Anthrax-Toxin, dem Cholera-Toxin oder Ricin wurden durch Zellfraktionierungsstudien analysiert (Wesche *et al.*, 1998; El Hage *et al.*, 2007; *et al.*, Frénoy *et al.*, 1992). Nachteile dieser Methode sind jedoch die möglichen Kontaminationen mit Proteinen anderer Fraktionen, welche eine eindeutige und quantitative Auswertung erschweren (Chazaud *et al.*, 1995). Durch die der Fraktionierung vorausgehende Zellyse kann keine Aussage über die Dynamik des Toxintransports in einer lebenden Zelle getroffen werden; auch die Lokalisation der A/B-Toxine in subzellulären Kompartimenten ist nicht immer eindeutig möglich.

Intakte *S. cerevisiae*-Zellen zeigten in dieser Arbeit nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} eine starke periphere Fluoreszenz, wobei keine Bewegung der fluoreszierenden Strukturen detektiert werden konnte. Die Erhöhung der Auflösung durch Einsatz der konfokalen Laserscanning Mikroskopie oder der „Structured Illumination“ Mikroskopie (SIM) bestätigte das Fluoreszenzmuster im Zellrandbereich. Mit dieser Technik konnten simultan Chromatin, Kernlamina und der Kernporenkomplex in Säugerzellen dargestellt werden, wobei sogar einzelne Komponenten des Komplexes lokalisiert und Einstülpungen der Kernhülle in der Prophase sichtbar wurden (Schermelleh *et al.*, 2008). Trotz der zweifach erhöhten Auflösung, verglichen mit der konfokalen Laserscanning Mikroskopie, wurde die SI-Mikroskopie bisher nicht zur Visualisierung der A/B-Toxin-Internalisierung beschrieben. Das A/B-Toxin K28, fusioniert mit mCherry, konnte in der vorliegenden Arbeit auch mit dieser Methode nur im Zellrandbereich als „ringförmige“ Fluoreszenz detektiert werden. Die Kollokalisierung mit dem amphiphatischen Fluoreszenzfarbstoff „Cell mask deep red“ lässt auf eine Plasmamembran- oder Zellwandlokalisation der fluoreszierenden K28-Moleküle schließen. In Säugerzellen lagert sich dieser Farbstoff in die Plasmamembran ein; in Hefezellen wurde er bisher nur zur Gegenfärbung der gesamten fixierten und permeabilisierten Zelle genutzt (Steffen *et al.*, 2010). Licht- und fluoreszenzmikroskopisch sind Zellwand und Plasmamembran der Hefe kaum zu unterscheiden, nur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist eine Abgrenzung möglich (Osumi, 1998).

Das durch K28-mCherry^{HDEL} erzeugte Fluoreszenzmuster nach Inkubation mit einer wildtypischen sensitiven Hefezelle konnte in dieser Arbeit dennoch der Zellwand zugeordnet werden: Zunächst zeigte sich keine Kollokalisierung mit dem GFP-markierten HDEL-Rezeptor Erd2p. Die Erd2p-GFP-Rezeptorvariante ist funktionell und konnte bereits zu Kollokalisationsstudien mit weiteren mCherry-markierten Plasmamembrankomponenten

verwendet und in geringer Kopienzahl an der Plasmamembran der Hefezelle nachgewiesen werden, wo Erd2p als Sekundärrezeptor für K28 fungiert (Dausend, 2010). Die fehlende Kolo-kalisation des fluoreszenzmarkierten Toxins mit dem Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran lässt eher auf eine Zellwandbindung von K28-mCherry^{HDEL} schließen, wobei eine Interaktion mit dem Toxinrezeptor nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren stimmte das durch die fluoreszierende Toxinchimäre verursachte Fluoreszenzmuster mit der Calcofluor White-Fluoreszenz überein. Dieser Farbstoff bindet irreversibel an Chitin der Hefezellwand und ist daher auch verstärkt im Bereich der Sproßnarben nachzuweisen (Darken, 1962; Pringle, 1991; Baggett *et al.*, 2003).

Schmitt und Radler identifizierten 1987 den K28-Rezeptor auf Zellwandebene: Eine Mannoproteinpräparation, isoliert aus der *S. cerevisiae*-Zellwand, konnte das Toxin binden und dessen Toxizität abschwächen (Schmitt & Radler, 1987). Analog dazu verhinderte in der vorliegenden Arbeit die Zugabe von Mannoprotein die Bindung von K28-mCherry^{HDEL} an die sensitive Hefezelle. Der Kohlenhydratanteil der Zellwandmannoproteine besteht aus einem α -1,6-verknüpftem Rückgrat mit mehreren Seitenketten (Cohen *et al.*, 1982). Defekte in diesen Seitenketten, welche die Mannoproteinmutanten $\Delta mnn2$ und $\Delta mnn5$ aufweisen, führten zur Toxinresistenz, da keine K28-Absorption mehr stattfinden konnte (Schmitt & Radler, 1988). Mnn2p und Mnn5p besitzen α -1,2-Mannosyltransferase-Aktivität, so dass die entsprechenden Deletionsmutanten keine oder stark verkürzte äußere Seitenketten tragen (Nakajima & Ballou, 1974; Cohen *et al.*, 1980). Die Inkubation einer $\Delta mnn2$ -Deletionsmutante mit K28-mCherry^{HDEL} resultierte in einem veränderten, punktförmigen Fluoreszenzmuster in der Zellperipherie, dessen Intensität deutlich reduziert war.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte die K28-mCherry^{HDEL}-Behandlung von Sphäroplasten; auch hier zeigten sich schwache punktförmige Signale in der Zellperipherie. Ebenfalls für eine Fluoreszenz der Zellwand von K28-mCherry^{HDEL} behandelten Hefen spricht der Verlust der Fluoreszenzsignale nach Entfernen der Zellwand. Bestätigt wurde diese Theorie durch Inkubation sensibler Hefezellen mit der Toxinvariante K28-mCherry^A, deren C-terminales HDEL-Signal fehlt und somit wahrscheinlich keine Interaktion mit dem Plasmamembranrezeptor mehr möglich ist. HDEL-ähnliche Peptide sind die einzigen bisher bekannten Motive, welche eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor Erd2p vermitteln (Munro & Pelham, 1987; Pelham *et al.*, 1988; Semenza *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1990; Raykhel *et al.*, 2007). Die Toxininfusion K28-mCherry^A zeigte wie wtK28^A keine Toxizität gegenüber sensiblen Hefezellen (Eisfeld *et al.*, 2000). Dennoch absorbierte K28-mCherry^A an die Hefezelle, wobei fluoreszenzmikroskopisch kein Unterschied zwischen K28-mCherry^{HDEL} und K28-mCherry^A behandelten Zellen ersichtlich wurde. Die Inkubation von Sphäroplasten mit K28-mCherry^A ergab ebenfalls nur schwache punktförmige Fluoreszenzsignale in Zellrandbereich, wobei es sich vermutlich um Zellwandreste handelte.

Des Weiteren ist folgende Beobachtung ein Indiz für eine K28-mCherry^{HDEL} bedingte Fluoreszenz der Zellwand: Die Behandlung mit dem metabolischen Inhibitor Azid übte keinen Effekt auf das Fluoreszenzmuster aus. Die Zellwandbindung von Killertoxinen wie K28 erfolgt Energie-unabhängig, die Internalisierung jedoch Energie-abhängig (Schmitt *et al.*, 1989). Entsprechend konnte Heiligenstein belegen, dass eine K28-Internalisierung durch einen metabolischen Inhibitor wie Azid verhindert wird; eine Beobachtung, die eine Toxinaufnahme durch Endozytose, einem Energie-abhängigen Prozess, nahe legt (Pearse & Bretscher, 1981; Heiligenstein, 2008).

Das Fluoreszenzmuster K28-mCherry-behandelter Hefezellen entspricht dem Toxin-produzierender Killerhefen. *Pichia anomala* sekretiert das Toxin KT4, welches durch Immunfluoreszenz an deren Zelloberfläche nachgewiesen wurde. Die Elektronenmikroskopie bestätigte eine Akkumulation des Toxins an der Zellwand der Toxin-produzierenden Zellen (Cailliez *et al.*, 1992). Killerhefen sind immun gegen das von ihnen sezernierte Toxin. Diese Immunität manifestiert sich jedoch meist nicht auf Ebene der Zellwand, sondern wird beispielsweise durch vakuolären Abbau des Sekundärrezeptors von K1 oder proteasomale Degradation des aufgenommenen K28-Toxins im Zytosol der Killerhefe bedingt (Sturley *et al.*, 1986; Douglas *et al.*, 1988; Breinig *et al.*, 2006). Ähnlich wie *P. anomala* das Toxin KT4 an der Zellwand akkumuliert, so konnte auch das Killertoxin WmKT an der Zelloberfläche der Hefe *Williopsis saturnus* var. *mrakii* während der Toxinsekretion durch Immunfluoreszenz lokalisiert werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigten die Spezifität dieser Nachweismethode (Guyard *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen sprechen ebenfalls für eine Fluoreszenz im Bereich der Zellwand K28-mCherry^{HDEL} behandelte Hefezellen. Während der Toxinproduktion in *P. pastoris* wurde allerdings keine Akkumulation des fluoreszenzmarkierten Toxins an der Zellwand festgestellt. Dies ist darin begründet, dass sich *P. pastoris* resistent gegenüber wildtypischem K28 verhält (Daten nicht gezeigt), was vermutlich unter anderem auf Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung und damit dem K28-Primärrezeptor zurückzuführen ist, so dass eine Bindung an die Zellwand unterbleibt. Diese Differenzen gehen auf die verschiedenen natürlichen Habitate zurück. Ebenso verhielten sich *Pichia kluyveri* und *Schwanniomyces alluvius* resistent gegen das *S. cerevisiae* Killertoxin K1, was mitunter ebenfalls durch eine fehlende Zellwandbindung bedingt ist (Zhu & Bussey, 1989). Des Weiteren konnte eine pH-Abhängigkeit der Zellbindung von K28-mCherry^{HDEL} festgestellt werden. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes kam es zu einem Intensitätsverlust der peripheren Fluoreszenz sowie einer Veränderung des Fluoreszenzmusters. Auch das Killertoxin WmKT von *Williopsis saturnus* var. *mrakii* bindet pH-abhängig an die Zellwand der Zielzelle, was durch indirekte Immunfluoreszenz belegt wurde (Guyard *et al.*, 2002). Folglich wird die pH-Abhängigkeit der K28-Wirkung wahrscheinlich nicht nur von der Interaktion mit dem Plasmamembranrezeptor sondern auch von der Bindung an die Zellwand bestimmt (siehe oben).

Die K28-Zellbindung konnte in dieser Arbeit eindeutig auf die β -Untereinheit zurückgeführt werden. Weder mCherry noch mTFP zeigten eine Bindung an die Hefezelle. Auch durch das Anfügen eines C-terminalen HDEL-Motivs an diese Fluoreszenzproteine veränderte sich dieses Ergebnis nicht. Eine β -mCherry^{HDEL}-Fusion, die durch Reduktion von K28-mCherry^{HDEL} entstanden war, führt hingegen zu einer starken ringförmigen Fluoreszenz im Zellrandbereich. Da auch die Inkubation mit einer K28-mCherry-Variante ohne HDEL-Signal eine starke Zellwandbindung bedingte, kann der β -Untereinheit eindeutig diese Funktion zugeordnet werden. Vorherige Untersuchungen von Spindler hatten die Notwendigkeit des HDEL-Motivs am C-Terminus der β -Untereinheit für die Toxinaufnahme durch Sphäroplasten und den intrazellulären Transport herausgestellt (Spindler, 2004). Die B-Fragmente der A/B-Toxine sind gemeinhin für die Zellbindung verantwortlich (Falnes & Sandvig, 2000). Die B-Untereinheit des Shiga-Toxins kann sogar als „delivery tool“ beim Tumortargeting oder der Immuntherapie genutzt werden (Johannes & Römer, 2010). Bei Hefetoxinen kommt der β -Untereinheit ebenfalls die Funktion der Zellbindung zu, wobei am Beispiel von K1 durch gerichtete Mutagenese eine Bindung an den Zellwandrezeptor bestätigt werden konnte (Sturley *et al.*, 1986; Zhu & Bussey, 1991).

Die Bindung an die Zellperipherie sensibler Hefezellen blieben in dieser Arbeit die einzigen detektierbaren Fluoreszenzsignale. Intrazellulär konnten mikroskopisch keine fluoreszierenden Toxinmoleküle visualisiert werden. Dabei wurden einige Parameter, welche die Toxin-Internalisierung durch Rezeptor-vermittelte Endozytose beeinflussen können, variiert: Die Inkubationsdauer zeigte keinen Effekt auf die Verteilung der K28-mCherry^{HDEL}-Fluoreszenz, deren Lokalisation sich auch nach 16 bis 72 h nicht änderte. Bereits nach fünfminütiger Inkubation war ein starkes Fluoreszenzsignal der Zellwand zu detektieren. Diese Beobachtung entspricht der Kinetik der K1 Bindung an den Zellwandrezeptor, die innerhalb einer Minute abläuft und bereits nach 5 min das Maximum erreicht (Kurzweilova & Sigler, 1994). Die Internalisierung des wildtypischen Killertoxins K28 scheint in dieser Hinsicht auch mit der des Pheromons α -Faktors vergleichbar abzulaufen. K28 konnte bereits nach 1 h im Zytosol der Zielzelle nachgewiesen werden (Heiligenstein *et al.*, 2006). Ein fluoreszenzmarkiertes Derivat des α -Faktors war schon nach 5 min in internen endozytotischen Kompartimenten lokalisiert, nach 20 min hauptsächlich in der Vakuole (Toshima *et al.*, 2006). Die Visualisierung der α -Faktor-Internalisierung gelang erst nach langwieriger Optimierung (Kaksonen, persönliche Mitteilung). Die Adaption dieses Protokolls zur K28-mCherry^{HDEL}-Internalisierung in der vorliegenden Arbeit hatte dennoch keinen positiven Effekt auf den intrazellulären Toxinnachweis.

Neben der Inkubationsdauer beeinflusst auch die Temperatur die Endozytose; bei niedrigen Temperaturen ist die endozytotische Aufnahme blockiert (Kuismanen & Saraste, 1989; Steinman *et al.*, 1983). Doch weder die Erhöhung noch die Absenkung der Inkubationstemperatur hatten eine detektierbare Auswirkung auf die K28-mCherry^{HDEL}-Lokalisation. Im Gegensatz dazu konnte Heiligenstein einen Einfluss der Temperatur auf die Internalisierung des wildtypischen K28-Toxins durch Zellfraktionierungsstudien belegen (Heiligenstein, 2008). Auch die Endozytose der Shiga- und Cholera-Toxine erfolgt abhängig von der Temperatur, wobei bereits nach kurzer Inkubation ein elektronenmikroskopischer Toxinnachweis in Endosomen und Golgi möglich war (Sandvig *et al.*, 1989; Hansen *et al.*, 2005).

Die Endozytose in Säugerzellen steht unter Einfluss der Glukose- und Calcium-Konzentration. So erhöhte eine ansteigende extrazelluläre Calciumkonzentration die Größe der endozytotischen Vesikel von Insulin-sekretierenden Zellen (MacDonald *et al.*, 2005). Auch die Wirkung des Killertoxins K28 scheint von der Calciumkonzentration abhängig zu sein, da die Abtötung sensitiver Hefen am effektivsten bei einer Calciumkonzentration von 50 mM im Kulturmedium abläuft (Kelkel, 2009). Zu den optimalen Bedingungen zur Wirkung des Killertoxins K1 auf Hefezellen zählen ebenfalls entsprechend angepasste Calcium- und Glukosekonzentrationen. Darüber hinaus konnte die Killeraktivität bei Verwendung sensitiver Zellen der exponentiellen Wachstumsphase gesteigert werden (Kurzweilova & Sigler, 1993). Ein entsprechend positiver Effekt auf die Endozytose von K28-mCherry^{HDEL} konnte durch Variation dieser Parameter in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden; das fluoreszenzmikroskopische Bild blieb unverändert. In eukaryotischen Zellen fungieren Calciumionen als ubiquitäre intrazelluläre Messenger, die eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Zellproliferation, Proteinsekretion und Apoptose regulieren (Berridge *et al.*, 1998, 2003). Die Calciumhomöostase wird durch spezifisch regulierte Systeme aufrechterhalten, so dass die intrazelluläre Calciumkonzentration auf einem niedrigen Niveau gehalten wird, was ein Calcium-„signalling“ ermöglicht. Die Vakuole der Hefe dient dabei als Calciumspeicher (Halachmi & Eilam, 1989; Cui & Kaandorp, 2006; Cui *et al.*, 2009). An der Kontrolle der intrazellulären Calciumkonzentration ist unter anderem die Calcium-ATPase Pmr1p beteiligt. Sie ist für den Import zytosolischen Calciums in die Organellen des sekretorischen Wegs verantwortlich. Veränderungen der Calciumkonzentration in diesen Kompartimenten beeinflussen die K28-Toxizität. Eine $\Delta pmr1$ -Mutante ist vollständig K28-resistent, da ein retrograder Transport entlang des Sekretionswegs unterbleibt (Heiligenstein *et al.*, 2006). Ein ähnliches Phänomen beschrieben Dürr *et al.* bei der Untersuchung des ER-Exports einer mutierten Form der Carboxypeptidase Y, deren Halbwertszeit sich in einer $\Delta pmr1$ -Mutante um das vierfache erhöhte, was auf eine Akkumulation des Proteins im ER zurückzuführen war (Dürr *et al.*, 1998). Entsprechend sollten Defekte der Calciumpumpe Pmr1p auch zu einer

Anreicherung von K28 im Sekretionsweg führen und dadurch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis ermöglichen. Allerdings konnte auch in einer *Δpmr1*-Mutante nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} nur die Fluoreszenz der Zellwand detektiert werden. Eine andere Möglichkeit, die intrazelluläre Toxinverteilung zu beeinflussen, bieten Mutanten, die eine Hypersensitivität gegen K28 zeigen. Die Überexpression des HDEL-Rezeptor Erd2p führte zu einer leichten Hypersensitivität gegen wildtypisches K28. Unter diesen Bedingungen laufen vermutlich Toxin-Internalisierung und retrograder Transport effizienter ab, da Erd2p sowohl als Sekundärrezeptor für K28 fungiert als auch das intrazelluläre Trafficking vermittelt (Spindler, 2004; Heiligenstein, 2008). Auf das Fluoreszenzmuster einer K28-mCherry^{HDEL}-behandelten Hefezelle hatte diese Überexpression jedoch keinen Einfluss, es blieb bei einem ringförmigen peripheren Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression des Säugerhomolog, dem KDEL-Rezeptor, führte zu einer vermehrten Lokalisation des Rezeptors im ER und einem verstärkten retrograden Transport (Hsu *et al.*, 1992). Da auch die Überexpression des Membranproteins TGN38, welches vornehmlich im *trans*-Golgi und teilweise auch an der Plasmamembran zu finden ist, nicht zu einer gesteigerten Zelloberflächenexpression führte, könnte auch der HDEL-Rezeptor Erd2p bei Überexpression nur bedingt in höheren Kopienzahlen an der Plasmamembran lokalisiert sein (Reaves & Banting, 1994; Banting & Ponnambalam, 1997).

Ein hypersensitiver Phänotyp wird auch durch Defekte im Transport zur Vakuole ausgelöst, da ein Teil des aufgenommenen Toxins zur Vakuole dirigiert und degradiert wird (Spindler, 2004; Heiligenstein, 2008). Die Deletion von *VPS34*, welches für eine Phosphatidylinositol-3-Kinase kodiert und am Transport löslicher vakuolärer Hydrolasen beteiligt ist, verursacht einen verstärkten retrograden Toxintransport und damit einen hypersensitiven Phänotyp (Herman & Emr, 1990; Heiligenstein, 2008). Durch deren Enzymaktivität wird Phosphatidylinositol an der zytosolischen Seite des späten Golgi-Apparats modifiziert, so dass Hüllproteine rekrutiert und stabilisiert werden und der Vesikeltransport von Golgi zur Vakuole stattfinden kann (Stack *et al.*, 1995). Durch die Deletion dieses Gens sollte sich die Toxinmenge im sekretorischen Weg erhöhen, was jedoch den intrazellulären fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von K28-mCherry^{HDEL} in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht ermöglichte.

Der Transport des pflanzlichen A/B-Toxins Ricin wird durch eine Kopplung mit Gold oder dem Enzym Meerrettich-Peroxidase beeinflusst, so dass die Konjugate nicht den Golgi-Apparat erreichen, sondern zu den Lysosomen transportiert werden (van Deurs *et al.*, 1986). Das gleiche Phänomen beschrieben Mellman und Plunter, da ein polyvalenter Ligand den Transport des gesamten Rezeptor/Liganden-Komplexes zur Vakuole bedingte und ein Recycling des Fc-Rezeptors verhinderte (Mellman & Plutner, 1984). Dementsprechend beeinflusste auch die Kopplung mit Nanopartikeln den Transport von Transferrin (Chithrani & Chan, 2007). Ein vollständiges Fehltargeting zur Vakuole kann bei der Internalisierung von

K28-mCherry^{HDEL} allerdings ausgeschlossen werden, da dessen toxische Wirkung auf sensitive Hefezellen belegt wurde. Diese impliziert einen retrograden Toxintransport und die Diffusion der α -Untereinheit in den Zellkern. Außerdem sollte auch eine vakuoläre Akkumulation des fluoreszenzmarkierten Toxins mikroskopisch nachweisbar sein. Fluoreszenzproteine wie GFP sind relativ resistent gegen eine vakuoläre Degradation; der GFP-Anteil eines Fusionsproteins bleibt meist für eine große Zeitspanne stabil in der Vakuole oder dem Lysosom nachweisbar (Prosser *et al.*, 2010). Allerdings kann es aufgrund des niedrigen pH-Wertes in diesen Organellen zu einem Verlust der Fluoreszenz kommen. Jedoch wurde mTFP erfolgreich zur Detektion lysosomaler Proteine eingesetzt (Ai *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu GFP ist auch mCherry ein sehr säurestabiles Protein, was auch bei einem pH von 4,8 noch eine intensive Fluoreszenz aufweist (Shaner *et al.*, 2004, 2005). Es wurde daher in Säugerzellen zur Proteindetektion in sauren Vesikeln eingesetzt. Dazu wurde eine „double tag“-Strategie angewendet, indem sowohl GFP als auch mCherry an das zu detektierende Protein fusioniert wurden. Aufgrund der unterschiedlichen pH-Sensitivität der beiden Fluoreszenzproteine konnte zwischen neutralen „inclusion bodies“, Autophagosomen und saure Autolysosomen unterschieden werden (Pankiv *et al.*, 2007).

Das Fluoreszenzprotein mTFP weist eine geringere Resistenz gegenüber niedrigen pH-Werten als mCherry auf, dennoch bietet die Verwendung dieses Proteins einen wichtigen Vorteil, die Möglichkeit des „Quenching“ durch Bromphenolblau. Dabei kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität durch einen Resonanz-Energie-Transfer vom Fluorophor zum Bromphenolblau, da das Emissionsspektrum des Fluorophors teilweise mit dem Absorptionsspektrum von Bromphenolblau überlappt. Da Bromphenolblau aufgrund seiner Hydrophilie kaum membrangängig ist, eignet es sich sehr gut zum Quenchen extrazellulärer Fluoreszenz. Harata *et al.* nutzten diesen Mechanismus, um die Kinetik des exo-endozytotischen Recyclings an Synapsen zu bestimmen (Harata *et al.*, 2006). Das rot fluoreszierende Protein DsRed kann ebenfalls durch Kupferionen gequencht werden (Rahimi *et al.*, 2008). Dieses Verfahren wurde bisher jedoch nur für das tetramere DsRed und seine Varianten, nicht aber für mCherry beschrieben und konnte daher auch nicht für K28-mCherry^{HDEL} bestätigt werden. Das Ziel dieser Vorgehensweise war es, die intensive Fluoreszenz, welche von Zellwand-gebundenen fluoreszenzmarkierten K28-Molekülen ausgeht, zu reduzieren, um mögliche schwache intrazelluläre Signale besser detektieren zu können. Doch nach dieser Behandlung war sowohl extrazellulär als auch intrazellulär keine Fluoreszenz mehr nachweisbar. Dieser Versuchsansatz entsprach auch vom Ergebnis her einer Toxinbehandlung mit anschließender Sphäroplastierung, wobei die an die Zellwand gebundenen K28-Chimären entfernt wurden.

Sphäroplasten, die mit mCherry^{HDEL} oder mTFP^{HDEL} inkubiert wurden, ergaben ebenfalls kein Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Beide Proteine sollten durch Wechselwirkung mit dem Plasmamembran-ständigen HDEL-Rezeptor endozytiert und retrograd transportiert werden. Die Aufnahme eines HDEL-tragenden Fluoreszenzproteins durch Hefesphäroplasten wurde jedoch durch Zellfraktionierungsexperimente belegt (Spindler, 2004). Ein entsprechender fluoreszenzmikroskopischer Nachweis konnte allerdings dabei auch von Spindler nicht erbracht werden.

Die Nachweisgrenze zur Detektion von GFP wurde 1997 mit 10.000 Molekülen im Zytoplasma einer Gewebekulturzelle angegeben (Patterson *et al.*, 1997). Mittlerweile ist unter optimalen Bedingungen sogar die Visualisierung einzelner Moleküle möglich. So wurden einzelne Kinesin-Moleküle, fusioniert mit ein bis drei Proteinen mCitrine, im Zytoplasma von Säugerzellen getrackt (Cai *et al.*, 2007). In *Ustilago maydis* konnten Kernporen, welche 16 Kopien einer Nup107-GFP-Fusion enthielten, fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Schuster *et al.*, 2011). Die intrazelluläre Visualisierung von fluoreszenzmarkiertem K28-Toxin konnte allerdings auch mit hochauflösenden Mikroskopie-Techniken nicht erreicht werden. Dies lässt auf eine sehr geringe Menge an internalisiertem Toxin schließen. Während der Analyse der A/B-Toxin-Internalisierung wurde ebenfalls festgestellt, dass die Toxinkonzentrationen in den einzelnen Kompartimenten der Zielzelle zu gering zur mikroskopischen Darstellung sein können (Sandvig & van Deurs, 2002). Lange konnte Ricin nicht im ER nachgewiesen werden, obwohl diese Lokalisation aufgrund von Glykosylierungen einer genetisch-modifizierten Ricin-Variante bekannt war. Daher können A/B-Toxine, obwohl sie in einem bestimmten Organell nicht sichtbar sind, dennoch durch dieses transportiert werden. Aufgrund der Transportgeschwindigkeit kann dabei eine Visualisierung nicht möglich sein. Ein mikroskopischer Toxinnachweis in einem Kompartiment deutet dagegen auf einen langsamen oder nicht vorhandenen Transport hin (Rapak *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2006). Die elektronenmikroskopische Analyse von Säugerzellen nach sechzigminütiger Ricin-Inkubation ergab, dass nur 4 - 6 % der gesamten internalisierten Toxinmenge im Golgi lokalisiert war (van Deurs *et al.*, 1988).

Zur Elektronenmikroskopie der K28-Aufnahme musste zunächst eine Toxinvariante mit geeigneter Markierung hergestellt werden, da kein spezifischer K28-Antikörper zur Verfügung stand. K28-V5 erwies sich als weiterhin toxisch, auch die Toxinaufnahme konnte durch Zellaufschluss und Western-Analyse bestätigt werden. Das V5-Tag mit entsprechendem Antikörper wurde bereits erfolgreich zur elektronenmikroskopischen Analyse von Hefezellen verwendet (Griffith *et al.*, 2008). Allerdings zeigten die Aufnahmen K28-V5-behandelter Hefezellen keine spezifischen Signale (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen des „live cell imaging“ mit fluoreszenzmarkierten K28-Chimären dieser Arbeit und deutet auf eine sehr geringe Menge an internalisiertem K28 hin. Parallel

wurde die K28-V5-Variante mit dem Anti-V5-Antikörper auch zur Immunfluoreszenz nach Toxininkubation verwendet. Sowohl permeabilisierte und fixierte als auch lebende Zellen zeigten keinen Unterschied zur Negativkontrolle, was im Einklang mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie steht (Daten nicht gezeigt).

Die geringe internalisierte Toxinmenge kann unter anderem auf die geringe Kopienzahl des K28-Rezeptors Erd2p an der Plasmamembran zurückgeführt werden. Wie Kolokalisationsexperimente des überexprimierten HDEL-Rezeptors mit Plasmamembranproteinen deutlich machten, sind nur wenige Erd2p-Moleküle in der Plasmamembran vorhanden (Dausend, 2010). Auch die Expression des HDEL-Rezeptors unter endogenem Promotor im nicht artifiziellen System ist sehr gering; so konnten GFP- oder TAP-markierte Erd2p-Varianten nur als schwache, nicht quantifizierbare Signale detektiert werden, wobei die Molekülanzahl pro Zelle auf unter 50 geschätzt wurde (Huh *et al.*, 2003). Insgesamt könnte also die geringe Anzahl an HDEL-Rezeptoren sowohl an der Plasmamembran als auch im retrograden Sekretionsweg die K28-Internalisierung limitieren. Im Vergleich dazu wurde die Menge an α -Faktor-Rezeptoren einer haploiden *MATa* Zelle an der Zelloberfläche mit 10.000 Molekülen angegeben, was durch direkte Bindungsexperimente mit ^3H -markiertem α -Faktor bestimmt wurde (Jenness *et al.*, 1986; Riezman, 1993). Vor diesem Hintergrund gelang auch die Visualisierung der Endozytose einer fluoreszenzmarkierten α -Faktorvariante, so dass dieses Chimär mittlerweile auch als Modell-Cargo zur Untersuchung der Endozytose in *S. cerevisiae* verwendet wird (Toshima *et al.*, 2006, 2009).

Aufgrund der hohen Toxizität genügen schon wenige Moleküle von Ricin oder dem Diphtherie-Toxin, um den Tod einer Säugerzelle auszulösen. Unter optimalen Bedingungen reichen beispielsweise bereits einige Ricin-Moleküle, um 1500 Ribosomen zu inaktivieren (Eiklid *et al.*, 1980; Yamaizumi *et al.*, 1978). Im Vergleich dazu ist die aufgenommene Toxinmenge relativ hoch, da ca. 3×10^7 Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind; jedoch scheint der Transport bis in das Zytosol der Zelle sehr ineffizient abzulaufen (Refsnes & Munthe-Kaas, 1976). Darunter fällt neben dem vakuolären Transport einer Teilmenge des internalisierten Toxins auch die proteasomale Degradation nach der Translokation der toxischen A-Untereinheit aus dem ER in das Zytosol (van Deurs *et al.*, 1995, 1988; Sandvig & van Deurs, 2005).

Ein Anhaltspunkt für die Toxizität des viralen Killertoxins K1 ergaben Experimente mit ^{35}S -markiertem K1, denen entsprechend bis zu $2,8 \times 10^4$ Toxinmoleküle notwendig sind, um eine sensitive Hefezelle zu töten (Bussey *et al.*, 1979). Wie viele Moleküle K28 zur Abtötung einer Zelle mindestens den Zellkern erreichen müssen, ist nicht bekannt. Auch gibt es keine Angaben über die internalisierte Toxinmenge und die Verteilung in den einzelnen Kompartimenten. Wie oben erwähnt lassen die elektronenmikroskopischen Daten auf eine sehr geringe Anzahl an internalisierten K28-Molekülen schließen.

Neben der Visualisierung der K28-Internalisierung durch Hefezellen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die K28-Aufnahme durch Säugerzellen adressiert. Säugerzellen eignen sich aufgrund ihrer Größe eher zu mikroskopischen Untersuchung; HeLa-Zellen sind beispielsweise ungefähr fünf- bis zehnmal so groß wie *S. cerevisiae*-Zellen. Dies vereinfacht die Fluoreszenzmikroskopie, da subzelluläre Strukturen besser dargestellt werden können und auch die internalisierte Toxinmenge entsprechend größer und daher eher nachweisbar sein sollte.

Ein zweiter Aspekt dieser Untersuchung ist der Nachweis der Aufnahme eines viralen Hefetoxins durch höhere eukaryotische Zellen. Dieser Punkt gewinnt vor dem Hintergrund einer therapeutischen Anwendung des Killertoxins als spezifische Alternative zu herkömmlichen Präparaten zur Behandlung von Mykosen, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, an Relevanz (Selitrennikoff, 2001; Schmitt & Breinig, 2002). Die Killertoxine von *Williopsis markii*, *Pichia anomala*, *Pichia subpelliculosa*, *Saccharomyces globosus* und *Hanseniaspora valbyensis* zeigten keine zytotoxische Wirkung auf Säugerzellen (Salek, 2003). Da der intrazelluläre Transportweg von K28 jedoch größtenteils mit dem humanpathogener A/B-Toxine übereinstimmt, könnte auch eine Internalisierung des Hefetoxins erfolgen. Homologe zum K28-Membranrezeptor, dem HDEL-Rezeptor Erd2p, wurden auch in Säugerzellen identifiziert. Die drei KDEL-Rezeptoren erkennen eine Vielzahl an KDEL-ähnlichen Signalen, so dass eine Mutation des C-terminalen HDEL-Signals von K28 zu KDEL nicht notwendig ist. Das HDEL-Motiv wird ebenso wie das KDEL-Peptid von allen drei Rezeptoren erkannt, wobei die Interaktion zwischen Erd23 und dem HDEL-Motiv doppelt so stark ist wie mit einer KDEL-Sequenz (Raykhel *et al.*, 2007). Dass diese Rezeptoren auch in Säugerzellen an der Plasmamembran kolokalisieren, konnte bisher nicht eindeutig bestätigt werden. Allerdings gelang es, die Aufnahme einer FLAG/His-markierten K28-Variante durch Zellaufschluss und Western-Analyse zu belegen (Klein, 2009).

Ein toxischer Effekt auf Säugerzellen wurde bislang nicht nachgewiesen (Spindler, 2004; Kelkel, 2009; Klein 2009). Dies ist zum einen auf die verwendeten Zellen zurückzuführen, wobei es sich um Tumorzellen handelt, die die zelluläre Seneszenz umgehen, über unbegrenztes Zellteilungspotential verfügen und die Fähigkeit zur Apoptose verloren haben können. Diese Merkmale können eine toxische Wirkung von K28, das in Hefezellen einen Zellzyklus-Arrest auslöst, verhindern. Zum anderen werden die Toxizitätstests durch die Inkubationsbedingungen erschwert, da sowohl das Temperatur- als auch das pH-Optimum von K28 und anderen Killertoxinen nicht dem einer Säugerzelllinie entsprechen. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit versucht, einen Kompromiss bezüglich der Inkubationsbedingungen zu finden, der eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Säugerzellen nach Behandlung mit fluoreszierenden K28-Chimären erlaubt. Dabei konnten Fluoreszenzsignale im Zellrandbereich sowohl nach Inkubation mit K28-mCherry^{HDEL} als auch mit K28-mCherry^Δ

beobachtet werden. Da intrazellulär keine Toxinvariante nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass sich K28-mCherry eher unspezifisch an die Zellen anlagert. Eine HDEL-vermittelte Bindung an einen potentiellen Membranrezeptor kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da auch die Negativkontrolle ohne C-terminales HDEL-Signal in der Zellperipherie aggregierte. Ein solches Fluoreszenzmuster wurde bisher nicht bei anderen fluoreszenz-markierten A/B-Toxinen wie GFP-RTA oder den Letal- und Ödemfaktor des Anthrax-Toxin beschrieben (Zornetta *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006). Eine unspezifische Anlagerung von Killertoxinen an die Oberfläche von Säugerzellen wurde allerdings bei den Toxinen von *Williopsis mrakii* und *Saccharomyces globosus* festgestellt, was vermutlich einen leicht protektiven Effekt auf die Aufnahme des Shiga-Toxins ausübte (Salek, 2003). Dementsprechend könnte sich die K28-Aufnahme durch Säugerzellen auf eine sehr geringe Toxinmenge beschränken, wie es auch bei Hefezellen der Fall zu sein scheint. Dennoch bleibt eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Klein (2009), der K28 im Zelllysate nachweisen konnte und den Ergebnissen dieser Arbeit zur Internalisierung von K28-mCherry^{HDEL}. Um eine K28-Aufnahme durch höhere eukaryotische Zellen eindeutig zu belegen, müssten daher beide Versuchsansätze bestätigt und auf weitere Zelllinien, bestenfalls auch auf primäre Zellen, ausgeweitet werden.

Plasmamembranlokalisation des K28-Membranrezeptors Erd2p und deren physiologische Funktion

Die Aufnahme von A/B-Toxinen wird vorwiegend durch Endozytose vermittelt. Eine Ausnahme stellt das Adenylat-Cyclase Toxin aus *Bordetella pertussis* dar, dessen Translokation in das Zytosol der Zielzelle direkt über die Zytoplasmamembran stattfindet (Rogel & Hanski, 1992). Die Kinetik der K28-Internalisierung spricht ebenfalls für eine endozytotische Internalisierung. Bereits nach 5 bis 10 min war das α/β -Heterodimer im Zytosol der Toxin-behandelten Hefezelle nachweisbar, nach 30 min hatte das Signal seine maximale Stärke erreicht (Eisfeld, 2001). Auch die A-Untereinheit des Cholera-Toxins konnte nach 30 min im ER detektiert werden (Majoul *et al.*, 1996). Die Endozytose in Hefezellen ist ein schneller Prozess; der Rezeptor/Liganden-Komplex aus dem Pheromon α -Faktor und dessen Rezeptor Ste2p konnte 10 min nach Bindung in der Vakuole lokalisiert werden (Munn & Riezman, 1994; Geli & Riezman, 1996). Neben der Geschwindigkeit der K28-Internalisierung deuten weitere Untersuchungen auf eine Toxin-Endozytose hin. Eisfeld und Heiligenstein konnten zahlreiche Deletionsmutanten mit Defekten in der Rezeptor-vermittelten Endozytose identifizieren, welche an der Toxinaufnahme beteiligt sind (Eisfeld *et al.*, 2000; Heiligenstein, 2008). Die Frage nach dem Toxinrezeptor auf Ebene der Plasmamembran konnte erst kürzlich eindeutig beantwortet

werden, wohingegen der K28-Primärrezeptor, ein Mannoprotein der Zellwand, bereits 1987 identifiziert wurde (Dausend, 2010; Schmitt & Radler, 1987). In diesem Zusammenhang sollten auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Bestätigung von Erd2p als K28-Membranrezeptor und der damit implizierten Kolokalisation des Proteins an der Plasmamembran beitragen. Erste Hinweise auf eine Funktion von Erd2p als K28-Membranrezeptor lieferten Untersuchungen einer Δ *erd2*-Deletionsmutante, welche das Toxin an der Plasmamembran akkumulierte und folglich einen K28-resistenten Phänotyp zeigte (Cappel, 2006). Die Deletion des C-terminalen HDEL-Signals hatten den gleichen Effekt (Eisfeld *et al.*, 2000). Im Umkehrschluss konnte Spindler 2004 durch Anfügen eines C-terminalen HDEL-Signals die Aufnahme von GFP durch Sphäroplasten ermöglichen.

Das humane Homolog zum HDEL-Rezeptor, der KDEL-Rezeptor, ist im ER, dem intermediären ER-Golgi Kompartiment (ERGIC) und im Golgi-Komplex lokalisiert. Mittlerweile wurden drei humane KDEL-Rezeptoren beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation nicht unterscheiden (Raykehl *et al.*, 2007). Eine quantitative Analyse ergab, dass der KDEL-Rezeptor vor allem im ERGIC und dem *cis*-Golgi vorkommt, der fünfmal mehr Rezeptoren aufweist als der *medial*- oder *trans*-Golgi. Unter Stressbedingungen verändert sich diese Verteilung; die Überexpression von KDEL-Liganden führt zu einer vorwiegenden ER-Lokalisation. In Hefezellen wurde unter Stressbedingungen ebenfalls eine verstärkte Expression des HDEL-Rezeptors beschrieben (Tang *et al.*, 1993; Griffiths *et al.*, 1994; Lewis & Pelham, 1992; Orci *et al.*, 1997).

Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Hefezellen konnten den HDEL-Rezeptor in punktuellen Strukturen nachweisen, welche weder mit der Vakuole noch dem Nukelus assoziiert waren (Semenza *et al.*, 1990). Diese Verteilung zeigte auch eine Erd2p-GFP-Fusion, wobei einzelne Foci dem Bereich der Plasmamembran zugeordnet werden konnten (Dausend, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Strukturen teilweise mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff FM4-64 kolokalisiert werden. Dieser Endozytose-Marker bindet als amphipatisches Molekül an die Plasmamembran, wird endozytiert und akkumuliert schließlich in vakuolären Membranen (Vida & Emr, 1995; Wendland *et al.*, 1996). Daher dient er in Kolokalisationsstudien mit GFP-gekoppelten Komponenten der Endozytose-Maschinerie als Endosomen-Marker (Huckaba *et al.*, 2004; Kaksonen *et al.*, 2005). Das Fluoreszenzmuster von Erd2-GFP zeigte sowohl im Bereich der Plasmamembran als auch in den endosomalen Kompartimenten Überlappungen mit FM4-64. Die Fluoreszenzintensität einer Erd2-GFP-Fusion, welche unter Kontrolle des endogenen *ERD2*-Promotors exprimiert wurde, lag deutlich unter der einer überexprimierten Erd2-GFP-Variante. Allerdings blieb das Fluoreszenzmuster selbst unverändert. Auch konnte bereits die Funktionalität der Erd2-GFP-Fusion unter dem starken induzierbaren Promotor P_{GAL1} nachgewiesen werden (Dausend, 2010). Auf die Bestimmung eines Kolokalisationskoeffizienten wurde in dieser Arbeit verzichtet, da bei dieser

Fragestellung keine vollständige Kolo-kalisation zu erwarten war. Erd2p kommt hauptsächlich in ER und Golgi vor, so dass nur eine Subfraktion mit dem Plasmamembran- und Endosomenmarker kolo-kalisieren kann. Der α -Faktor-Transporter Ste6p hingegen konnte fast ausschließlich in endosomalen Kompartimenten im Vergleich mit FM4-64 detektiert werden (Kelm *et al.*, 2004).

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist ein eindeutiger Nachweis der Plasmamembran-lokalisierung eines Proteins nur bedingt möglich. Dies trifft besonders auf ER-Proteine zu, da sich das kortikale ER dicht unter der Plasmamembran befindet. Das Hefeprotein Sac1p, ein ER-Membranprotein, kontrolliert den Phosphatidylinositol-4-phosphat-Gehalt der Plasmamembran, wobei die Distanz zwischen beiden Strukturen weniger als 10 nm betragen kann (Stefan *et al.*, 2011). West *et al.* gaben einen durchschnittlichen Abstand von 33 nm zwischen der Plasmamembran und Plasmamembran-assoziiertem ER an, wobei beide Membranen über einen großen Bereich hinweg in einer solchen Nähe vorlagen, dass dort fast keine Ribosomen mit dem ER assoziiert waren (West *et al.*, 2011). Die partielle Kolo-kalisation von Erd2-GFP mit FM4-64 kann dennoch zum Nachweis der Plasmamembranlokalisierung des HDEL-Rezeptors beitragen, da das Vorhandensein von Erd2p in Endosomen in dieser Arbeit eindeutig gezeigt wurde, was eine Plasmamembranlokalisierung und Endozytose voraussetzt. Dafür spricht auch der Einfluss, den eine *END3*-Deletion auf die Mobilität des K28-Rezeptors ausübt. Bei verlangsamter Endozytose zeigte Erd2-GFP eine verringerte Mobilität (siehe unten).

Um eindeutig HDEL-Rezeptoren der Plasmamembran mikroskopisch darzustellen, wurde in dieser Arbeit ein Reportersystem etabliert, das spezifisch die Fluoreszenzmarkierung von Plasmamembranproteinen der Hefe *S. cerevisiae* ermöglicht. Das „SNAP-surface“-System wurde zur Anwendung in Säugerzellen konzipiert und beruht auf einer enzymatischen Reaktion zwischen dem Reporterprotein, einem DNA-Reparaturprotein, der O^6 -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase und einem fluoreszenzmarkierten Substrat, einem Benzylguaninderivat. Da auch nicht membrangängige Substrate zur Verfügung stehen, können spezifisch extrazellulär exponierte Reporterproteininfusionen detektiert werden (Keppler *et al.*, 2003, 2004). Mit Hilfe einer ähnlichen Technik wurden die Internalisierung und das Recycling eines humanen Geruchsrezeptors visualisiert sowie die „Turnover“-Rate bestimmt (Jacquier *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* wurde dieses System mit membrangängigen Substraten bisher zur Untersuchung der Septin-Stabilität und des -Recyclings während der Zellteilung und Entwicklung eingesetzt (McMurray *et al.*, 2008). Des Weiteren fand es Anwendung bei der Lokalisierung des Zellwandproteins Sag1p, wobei besonders die Möglichkeit einer „pulse-chase“-Markierung genutzt wurde (Vivero-Pol *et al.*, 2005). Die Darstellung von Plasmamembranproteinen mit nicht membrangängigen fluoreszenzmarkierten SNAP-Tag-Substraten wurde in *S. cerevisiae* bisher nicht beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals am Beispiel des Proteins Snc1p die selektive Markierung eines Plasmamembranproteins mit einem SNAP-Tag in der Hefe gezeigt werden. Snc1p wurde als Positivkontrolle generiert, da bereits eine Snc1-Suc2-Fusion zur erfolgreichen Exposition der Invertase Suc2p auf der Zelloberfläche in *S. cerevisiae* exprimiert wurde (Burston *et al.*, 2009). Snc1p ist ein Vesikel-assoziiertes Membranprotein, welches die Fusion exozytotischer Vesikel an der Zelloberfläche reguliert, anschließend internalisiert und zu endosomalen und Golgi-Kompartimenten transportiert wird, so dass es in neue Vesikel eingebaut werden kann (Lewis *et al.*, 2000). Die SNAP-Tag-Markierung einer Snc1-SNAP exprimierenden Hefezelle ergab eine Fluoreszenz der Zellmembran sowie einzelner endozytierter Vesikel, was der Verteilung von GFP-Snc1 entspricht. Eine Mutante mit deutlich verlangsamter Endozytose, $\Delta end3$, zeigte ausschließlich eine Plasmamembranlokalisation des Fusionsproteins, die ebenfalls mit der Lokalisation von GFP-Snc1 in einer $\Delta end3$ -Mutante übereinstimmte (Kaksonen *et al.*, 2005; Burston *et al.*, 2009).

Analog zu diesen Experimenten sollten C-terminal verkürzte Erd2p-Varianten mit dem SNAP-Tag fusioniert werden, so dass dieser auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exponiert wird. Weder nach Expression in wildtypischen noch in einer $\Delta end3$ -Mutante konnten diese Chimären mit dem SNAP-Tag Substrat nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich auf die trotz Überexpression geringe Anzahl an Erd2p-Molekülen zurückzuführen, die die Plasmamembran erreichen. Der Erd2p-eigene Rückhalte Mechanismus im Sekretionsweg ist nicht bekannt. Die ER-Retention von Membranproteinen kann durch das KKXX-Motiv am zytosolischen C-Terminus vermittelt werden, das mit COP I-Untereinheiten interagiert (Jackson *et al.*, 1990; Letourneur *et al.*, 1994; Cosson & Letourneur, 1994). In der Aminosäuresequenz von Erd2p konnte dieses Signal nicht identifiziert werden; das zusätzliche Anfügen einer entsprechenden Sequenz resultierte in einer leicht verminderten K28-Sensitivität, was auf eine verminderte Plasmamembranlokalisation bzw. einer Verlagerung der intrazellulären Verteilung des Rezeptors hin zum ER zurückgeführt werden kann (Dausend, 2010; Townsley *et al.*, 1994). Ein weiteres ER-Retentionsmotiv bestehend aus zwei Argininen, das ebenfalls die Rückführung von ER-Membranproteinen vermittelt, ist in der Erd2p-Aminosäuresequenz nicht enthalten (Schutze *et al.*, 1994). Das IXTPK-Signal, ein Transport-Motiv von Membranproteinen, welches beispielsweise für den Transport von Fus1p vom *trans*-Golgi zur Plasmamembran eine Rolle spielt, konnte nicht in der Aminosäuresequenz von Erd2p identifiziert werden (Barfield *et al.*, 2009). In Einklang damit hatten die Deletionen der an diesem Transport beteiligten Komponenten wie Chs5p, eine Untereinheit des multimeren Exomer-Komplexes, keine Auswirkung auf den K28-Phänotyp und damit auf die Toxinaufnahme der entsprechenden *S. cerevisiae* Mutante (Daten nicht gezeigt).

Eine Plasmamembranlokalisation des HDEL-Rezeptors wurde bisher in Hefezellen nur im Zusammenhang mit der K28-Internalisierung beschrieben, jedoch konnte der KDEL-Rezeptor auf der Oberfläche apoptotischer Säugerzellen nachgewiesen werden. Diese exponieren ER-residente Proteine, darunter auch Calnexin und Calreticulin auf der Zelloberfläche (Franz *et al.*, 2007; Obeid *et al.*, 2007). Auch in *S. cerevisiae* konnte das Calreticulin-Ortholog Cne1p auf der Zelloberfläche nach Induktion des Zelltods detektiert werden (Madeo *et al.*, 2009). Unter anderen physiologischen Bedingungen konnten ebenfalls ER-Proteine an der Plasmamembran lokalisiert werden. Darunter Tumorzellen, welche ebenfalls ER-Proteine auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. So wurden Hitzeschockproteine wie das KDEL-tragende GP96 eindeutig an der Plasmamembran von humanen Tumorzellen nachgewiesen. Durch Hitzeschock oder reduzierende Agenzien wurde diese Exposition noch verstärkt (Altmeyer *et al.*, 1996). Außerdem lokalisierten Wiest *et al.* ER-residente Chaperone auch auf der Zelloberfläche von unreifen Thymozyten, darunter Calnexin, Calreticulin, GRP94 und BiP (Wiest *et al.*, 1995, 1997). Da neben löslichen ER-Proteinen auch Membranproteine wie Calnexin in der Plasmamembran kolokalisieren können, ist ein ähnlicher Mechanismus auch für den HDEL-Rezeptor denkbar. Dessen unvollständige ER-Retention könnte durch eine nicht ausreichende Anzahl an funktionellen ER-Retentionsrezeptoren bedingt sein. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Maskierung des bisher nicht bekannten Erd2p-ER-Retentionsmotivs durch Konformationsänderungen. Die Plasmamembranlokalisation von Calnexin im Komplex mit CD3-Rezeptoren hat die physiologische Funktion der Signaltransduktion, wodurch die Differenzierung der unreifen Thymozyten eingeleitet wird (Wiest *et al.*, 1997). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob der Kolokalisation des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran ebenso eine physiologische Bedeutung zukommt.

Um diesen Punkt zu adressieren, sollte die Funktion der Kolokalisation von Erd2p an der Plasmamembran bestimmt werden. Neben der Rückführung luminaler ER-Proteine nach Modifikationen im Golgi-Apparat übt der HDEL-Rezeptor bzw. dessen Säugerhomolog weitere Aufgaben aus, darunter als „Signalling“-Rezeptor, wodurch das dynamische Gleichgewicht des Golgi-Komplexes aufrechterhalten wird (Pulvirenti *et al.*, 2008; Capitani & Sallese, 2009). Darüber hinaus ist der KDEL-Rezeptor an der ER-Qualitätskontrolle und der ER „stress response“, letzteres durch Induktion der Autophagie, beteiligt (Yamamoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011). Transgene Mäuse, welche eine mutierte KDEL-Rezeptor-Variante exprimieren, die weiterhin KDEL-Proteine erkennt, diese aber nicht mehr in das ER zurücktransportiert, bilden eine Kardiomyopathie aus (Hamada *et al.*, 2004). Die essentielle Bedeutung des HDEL-Rezeptors wurde mit der Rückführung ER-residenter Proteine aus dem Golgi-Apparat definiert, da alle lebensfähigen *erd2*-Mutanten weiterhin zu einer, wenn auch verminderten, Retention HDEL-tragender Proteine in der Lage sind. Da bisher kein Protein bekannt ist, dessen HDEL-vermittelter Rücktransport in das ER essentiell ist, scheint die essentielle Funktion von Erd2p

in der Retention mehrerer Proteine zu liegen. Zu diesen zählen unter anderem Kre5p, Pdi1p und Kar2p; diese Proteine erfüllen auch ohne HDEL-Motiv ihre essentiellen Funktionen (Hardwick *et al.*, 1990; Meaden *et al.*, 1990; LaMantia *et al.*, 1991; Townsley *et al.*, 1994). Die Retention von luminalen ER-Proteinen durch Erd2p könnte sich aber nicht nur auf den Golgi-Apparat beschränken, sondern auch darüber hinaus auch HDEL-tragende Proteine, welche sekretiert wurden, in das ER zurückführen und so den Verlust ER-residenter Chaperone minimieren. Wie Miesenböck *et al.* zeigen konnten, funktioniert der Retentionsmechanismus auch in den Kompartimenten des späten Golgi (Miesenböck & Rothman, 1995). Um die Rückführung eines natürlichen Erd2p-Liganden von der Ebene der Plasmamembran ausgehend nachweisen zu können, wurden in dieser Arbeit Kar2p-Varianten hergestellt und deren Aufnahme durch Hefesphäroplasten überprüft. Das Säugerortholog BiP wurde bereits auf der Oberfläche von unreifen Thymozyten identifiziert (Wiest *et al.*, 1997). Am Beispiel der Plasmamembran-Kolokalisation von Calreticulin in Tumorzellen wird deutlich, dass diese Proteine wahrscheinlich an einen Rezeptor gebunden vorliegen (Xiao *et al.*, 1999). Entsprechend könnte sich die Situation in Hefezellen darstellen.

Als Chaperon ist Kar2p an der Proteintranslokation durch den Sec61 Komplex, der Proteinfaltung, der Selektion fehlgefalteter Proteine zur Degradation sowie der „unfolded protein response“ beteiligt (Rose *et al.*, 1989; Normington *et al.*, 1989; Brodsky *et al.*, 1999; Kimata *et al.*, 2003). Das Hsp70-Protein Kar2p hat eine charakteristische Struktur, bestehend aus einer N-terminalen Nukleotid-Bindedomäne, welche durch einen flexiblen Linker mit einer C-terminalen Substrat-Bindedomäne verbunden ist. Deren C-Terminus endet mit einem HDEL-Motiv (Jiang *et al.*, 2005). Die Substrataffinität wird durch die ATP-Hydrolyse reguliert (Mayer & Bukau, 2005).

Zur Herstellung von Kar2p erwiesen sich sowohl *K. lactis* als auch *P. pastoris* als ungeeignet. Analog zur Sekretion von K28-Chimären wurden beide Hefegattungen zur Produktion von Kar2p getestet, wobei zumindest *K. lactis* geringe Mengen des Proteins sezernierte. Dies könnte evtl. auf das Kar2p-eigene Sekretionssignal zurückzuführen sein, das bisher nur in *S. cerevisiae* Anwendung fand (Simpson *et al.*, 1999). Nach einer von Corsi und Schekman beschriebenen Methode gelang es in der vorliegenden Arbeit jedoch, Kar2p in *E. coli* zu exprimieren und mittels N-terminalem His-Tag aus dem Zelllysatz zu reinigen. Dieses Protokoll ermöglichte die Herstellung von biologisch aktivem Kar2p, was sie durch die Bestimmung der ATPase-Aktivität des Enzyms bestätigten (Corsi & Schekman, 1997).

Der in dieser Arbeit durchgeführte Nachweis einer Erd2p-vermittelten Kar2p-Aufnahme basierte auf der Bestimmung der Zellvitalität einer temperatursensitiven *kar2^{ts}* Mutante: Nach Entfernung der Zellwand durch Sphäroplastierung wurden die Zellen mit Kar2p-Präparationen inkubiert und bei restriktiver Temperatur der gelöste Sauerstoff im Puffer als Maß für die Vitalität ermittelt. Die Zugabe von Kar2^{HDEL} ermöglichte dabei ein Überleben der Zellen. Das

Protein sollte von Plasmamembran-ständigen HDEL-Rezeptoren gebunden und endozytiert werden. Entsprechend dem retrograden Transport des Killertoxins K28 sollte auch Kar2^{HDEL} auf diesem Weg das ER erreichen und dort die Funktion des endogenen Kar2p bei restriktiver Temperatur übernehmen. Analog zu K28 sollte eine Proteinvariante ohne C-terminales HDEL-Signal nicht das Zielkompartiment erreichen (Eisfeld *et al.*, 2000). Allerdings zeigte die Negativkontrolle Kar2^Δ den gleichen positiven Effekt auf die Vitalität der Sphäroplasten. Dass dieser Effekt nicht durch beliebige Proteine in vergleichbarer Konzentration ausgelöst werden kann, bestätigten die Negativkontrollen, BSA sowie Lysat des Leervektors, welches analog zu den Kar2-Präparationen behandelt worden war; sie führten selbst in höchster Konzentration nicht zu einer Steigerung der Zellvitalität. Auch wenn die Kar2p-Funktionalität, gemessen an der ATPase-Aktivität, in dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnte, so deutet doch die Dosisabhängigkeit der durch Kar2^{HDEL} und Kar2^Δ hervorgerufenen positiven Effekte auf die Zellvitalität auf die Funktionsfähigkeit beider Enzyme hin. Alternativ könnte diese mit Hilfe eines ATPase-Assays, das nicht auf einer kolorimetrischen Reaktion sondern auf der Verwendung von radioaktiv-markiertem ATP beruht, ermittelt werden (Corsi & Schekman, 1997).

Da im Gegensatz zu K28 auch eine Kar2p-Variante ohne C-terminales HDEL-Signal von Sphäroplasten internalisiert und bis in das ER transportiert wurde, scheint ein Erd2p-unabhängiger Mechanismus zu existieren. Der Einsatz einer *erd2*-Mutante war aufgrund des auf der Temperatursensitivität von *kar2^{ts}* basierenden Vitalitätsassay nicht möglich. Daher sollte der retrograde Transport durch die Zugabe von Brefeldin A blockiert werden. Diese aus *Penicillium brefeldianum* gewonnene Substanz inhibiert den Nukleotidaustausch des ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF), was die Assemblierung von zytosolischen Hüllproteinen, unter anderem von COP I-Komponenten, verhindert, so dass der Golgi-Apparat schließlich zerfällt (Sciaky *et al.*, 1997; Chardin & McCormick, 1999). Diese Wirkungsweise konnte auch in *S. cerevisiae* bestätigt werden, wobei intakte wildtypische Zellen nur bei BFA-Zugabe in hohen Konzentrationen sensitiv sind (Peyroche *et al.*, 1999). Der Vesikeltransport in Sphäroplasten hingegen kann durch BFA inhibiert werden (Bandlow *et al.*, 1995). Wie in dieser Arbeit bestätigt wurde, hatte die BFA-Zugabe keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität einer sphäroplastierten wildtypischen Hefe. Der positive Effekt von Kar2^{HDEL} und Kar2^Δ auf Zellvitalität einer *kar2^{ts}*-Mutante wurde jedoch bereits durch die BFA-Lösungsmittelkontrolle fast vollständig aufgehoben. Vermutlich wurden durch das Lösungsmittel Ethanol die Kar2p-Enzyme inaktiviert.

Neben der Aufnahme einer Kar2^Δ-Variante wurde auch die endozytotische Internalisierung der Ricin-A-Untereinheit, RTA, durch Hefesphäroplasten beschrieben. Dabei hatte RTA den gleichen toxischen Effekt wie RTA^{HDEL}, wenn die Toxine in hohen Konzentrationen eingesetzt wurden (Becker & Schmitt, 2011). Wie die Aufnahme und der retrograde Transport ablaufen,

ist noch nicht bekannt. Ebenso wie die Kar2-Chimären besaßen auch die RTA-Varianten ein His-Tag, was die Aufreinigung aus *E. coli*-Lysat erlaubte. Die positive Ladung des His-Tags kann sich auf das Protein selbst auswirken: Durch die His-Markierung wurden die Bindungs- und Translokationskapazität sowohl des Ödem- als auch des Letalfaktors des Anthrax-Toxins erhöht und damit die Toxizität gesteigert (Neumeyer *et al.*, 2006). Um diesen möglichen Einfluss zu eliminieren, könnte das His-Tag durch Enterokinase-Behandlung entfernt oder durch eine andere Markierung ersetzt werden. Desweiteren könnte das His-Tag genutzt werden, um durch Markierung mit fluoreszierenden Nickel-Konjugaten die Lokalisation der Kar2-Chimären in der Hefezelle zu bestimmen und eventuelle Unterschiede zwischen Kar2^A und Kar2^{HDEL} zu detektieren (Zhao *et al.*, 2010).

Die Lokalisation des HDEL-Signals zur ER-Retention ist nicht auf den äußersten C-Terminus des Proteins beschränkt. Erkenntnisse dazu sind aus Versuchen zur Aufnahme des Killertoxins K28 hervorgegangen. Wurde die Abspaltung des terminalen Argininrests im späten Golgi durch Deletion der Carboxypeptidase Kex1p verhindert, war das Toxin inaktiv (Eisfeld *et al.*, 2000). War das HDEL-Motiv jedoch ca. 8 - 14 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt, blieb dessen biologische Aktivität erhalten, wie am Beispiel von K28^{HDEL}RStrep oder K28^{HDEL}RFLAGHis dargestellt wurde (Cappel, 2006; Guida, 2007). Die Analyse der Kar2p-Sequenz ergab, dass sich an Position 501 des unprozessierten Proteins, 180 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt, ein KFEL-Motiv befindet. Dieses Peptid bedingt die ER-Lokalisation eines Reporterproteins, wenn es an dessen C-Terminus lokalisiert ist (Raykhel *et al.*, 2007). Ob KDEL-ähnliche Signale auch erkannt werden, wenn sie sich an einer anderen Position innerhalb des Proteins befinden, ist nicht bekannt. Dafür spricht, dass weitere essentielle luminaire ER-Proteine wie Pdi1p und Kre5p, die ein C-terminales HDEL-Signal besitzen, auch innerhalb der Aminosäuresequenz HDEL-ähnliche Motive aufweisen. Am Beispiel der ER-Chaperone FKBP7 und FKBP14 zeigte sich, dass die Deletion des C-terminalen ER-Retentionssignals nicht deren subzelluläre Lokalisation veränderte (Raykhel *et al.*, 2007). Datenbankanalysen ergaben, dass in Säugerzellen 54 Proteine ein C-terminales KDEL-Motiv besitzen, wohingegen über 1000 eine KDEL-Abfolge innerhalb ihrer Aminosäuresequenz enthalten (Bahir & Linial, 2005). Um eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen internen KDEL-Signalen und einer ER-Lokalisation treffen zu können, müssten in die Analysen auch alle weiteren möglichen KDEL-ähnlichen Signale, von denen in Säugerzellen ca. 50 beschrieben wurden, mit einbezogen werden.

Eine mögliche Funktion des HDEL-Rezeptors an der Plasmamembran besteht in der Aufnahme und Rückführung von sezernierten ER-Chaperonen. Dies wäre nicht das einzige Beispiel eines Rezeptors, der eingebunden in einen zentralen intrazellulären Mechanismus, zusätzliche Aufgaben an der Plasmamembran ausübt. Der Kationen-unabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-MPR) transportiert neu synthetisierte saure Hydrolasen vom *trans*-

Golgi-Netzwerk zu den Endosomen für ihren weiteren Transfer zu den Lysosomen. Zusätzlich ist der Rezeptor in eine Reihe weiterer physiologischer Prozesse involviert, die auf dessen Kolokalisation an der Zelloberfläche basieren, wobei Liganden auch unabhängig von Mannose-6-Phosphat-Modifikationen erkannt werden können (Ghosh *et al.*, 2003). Es gibt mehrere Wege, wodurch der Rezeptor die Plasmamembran erreichen kann: eine Fehlsortierung im *trans*-Golgi-Netzwerk und/oder das Recycling aus frühen oder späten Endosomen (Riederer *et al.*, 1994; Tikkanen *et al.*, 2000). An der Plasmamembran bindet und internalisiert der Rezeptor den „insulin-like growth factor II“ (IGF-II) und reduziert so die extrazelluläre Menge des Mitogens. Eine weitere Funktion ist die Aktivierung des „transforming growth factor- β 1“ (TGF- β 1) Vorläufers, ein Prohormon, das Zellwachstum und Differenzierung beeinflusst. Das Protein wird in inaktiver Form sezerniert und in der extrazellulären Matrix gespeichert (Dennis & Rifkin, 1991; Godar *et al.*, 1999). Zudem bindet der Rezeptor Retinsäure, was zu Änderungen der Zellgestalt, einer Wachstumsinhibierung und einer Induktion der Apoptose führen kann (Kang *et al.*, 1999). Die schnelle Internalisierung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors wird durch mehrere Endozytose-Motive vermittelt, die die Interaktion mit Adapterproteinen ermöglichen (Jadot *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1990; Denzer *et al.*, 1997). Dass entsprechende Sequenzen auch in den zytoplasmatischen Bereichen des HDEL-Rezeptors Erd2p identifiziert wurden (siehe unten), spricht ebenfalls für dessen Funktion als Plasmamembranrezeptor.

Endozytose des Erd2p/K28-Rezeptor/Liganden-Komplexes

Seit der ersten Beschreibung der Endozytose, der Proteinaufnahme durch Mosquito-Oozyten, wird dieser Prozess in höheren eukaryotischen Zellen, vor allem in Säugerzellen analysiert (Roth & Porter, 1964). Von besonderem Interesse sind dabei die endozytotischen Mechanismen, die von A/B-Toxinen genutzt werden, um in ihr Zielkompartiment zu gelangen. Diese sind allerdings bisher im Hinblick auf molekulare Interaktionen und beteiligte Proteine kaum charakterisiert (Sandvig & van Deurs, 2002). Auch Hefezellen werden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Rezeptor-vermittelten Endozytose und der einfachen genetischen Manipulierbarkeit zur Aufklärung dieses Prozesses eingesetzt, wobei bereits zahlreiche beteiligte zelluläre Komponenten, Proteine und Lipide, identifiziert werden konnten, deren Orthologe auch an der Endozytose in höheren Eukaryoten beteiligt sind. Mehr als 60 Proteine konnten aufgrund ihrer Funktion oder Lokalisation der Endozytose zugeordnet werden (Munn, 2001; Robertson *et al.*, 2009).

Erste Indizien, welche eine endozytotische Aufnahme des Hefetoxins K28 nahe legten, basierten auf einem veränderten Phänotyp von Deletionsmutanten bezüglich der K28-Sensitivität. Demnach ist K28 das bislang einzige Killertoxin, welches nach Bindung an die Zelloberfläche durch Endozytose internalisiert wird (Eisfeld *et al.*, 2000; Schmitt & Breinig, 2006). Die Identifizierung von Erd2p als Plasmamembranrezeptor von K28 hat neue Möglichkeiten eröffnet, diesen Prozess zu analysieren. Die Kombination aus dem HDEL-Rezeptor Erd2p und dem Liganden K28 kann auch als ein Modellsystem zur Charakterisierung der Endozytose eines A/B-Toxins angesehen werden und damit eine Alternative zum dem in *S. cerevisiae* häufig genutzten α -Faktor und dessen Rezeptor Ste2p bieten. In der vorliegenden Arbeit wurden daher sowohl weitere Deletionsmutanten bezüglich eines im Vergleich zum Wildtyp veränderten K28-Phänotyps untersucht als auch durch Fluoreszenzmarkierung oder Mutation des HDEL-Rezeptors die Endozytose des Rezeptor/Liganden-Komplexes adressiert.

Die endozytotische Internalisierung in *S. cerevisiae* kann in die „fluid-phase“ und Rezeptor-vermittelte Endozytose unterteilt werden, wobei K28 durch beide Mechanismen internalisiert werden kann. Erstere ist ein nicht sättigbarer Prozess, der von der extrazellulären Konzentration des zu endozytierenden Moleküls bestimmt wird. Dieser unspezifische Mechanismus scheint die K28-Internalisierung bei für das Toxin nicht optimalen pH-Bedingungen zu vermitteln, wobei K28 seine toxische Aktivität nicht entfalten kann, da es zur Vakuole transportiert wird (Spindler, 2004). Im Gegensatz dazu steht die Rezeptor-vermittelte Endozytose, deren komplexer Ablauf Gegenstand der Forschung ist. Ob auch in *S. cerevisiae* mehrere Mechanismen der Rezeptor-abhängigen Endozytose wie in Säugerzellen existieren, ist nicht bekannt; weiterhin lässt sich die Rezeptor-vermittelte Endozytose in Hefezellen nicht eindeutig einem entsprechenden Endozytose-Weg in Säugerzellen zuordnen (Kirkham & Parton, 2005).

Die Zusammensetzung der Plasmamembran spielt auch hinsichtlich der Lipide eine entscheidende Rolle bei der Endozytose in *S. cerevisiae*, spezifische Sterole und Sphingolipide sind dazu notwendig. Ein Screening von Deletionsmutanten in der vorliegenden Arbeit ergab in diesem Zusammenhang eine Hypersensitivität einer $\Delta erg6$ -Mutante. Die Mutation betrifft die Methylierung der Sterol-Seitenketten und hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Endozytose; erst in Kombination mit weiteren Deletionen, die die Ergosterol-Synthese betreffen, sind schwerwiegende Endozytose-Defekte beschrieben (Munn *et al.*, 1999). Grossmann *et al.* konnten allerdings eine verringerte Glukose-Aufnahme durch den HUP1-H⁺-Symporter in einer $\Delta erg6$ -Mutante feststellen (Grossmann *et al.*, 2006). Erg6p ist bei der Bildung von kleinen, sehr stabilen Ergosterol-reichen Kompartimenten der Plasmamembran involviert. $\Delta erg6$ Mutanten können diese Kompartimente nicht ausbilden, was z. B. zu einer konstitutiven Internalisierung des Tryptophan-Transporters Tat2p führt

(Grossmann *et al.*, 2008, Umebayashi *et al.*, 2003). Die K28-Hypersensitivität nach Deletion von *ERG6* könnte eher auf die erhöhte Membranpermeabilität zurückzuführen sein, die auch die Aufnahme von Brefeldin A durch eine $\Delta erg6$ -Mutante ermöglicht (Vogel *et al.*, 1993). Dies beruht auf der veränderten Membranpermeabilität und -fluidität (Gaber *et al.*, 1989). Weiterhin wird durch die *ERG6*-Deletion der Transport zur Vakuole vermindert, was ebenfalls die K28-Hypersensitivität erklären könnte (Hoffman & Chiang, 1996).

Ergosterol akkumuliert in einem Kompartiment der Plasmamembran, das als MCC („membrane compartment of Can1p“) bezeichnet wird (Grossmann *et al.*, 2007). Das MCC bildet „patch“-artige Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 300 nm. Komplementär dazu ist das MCP („membrane compartment of Pma1p“) netzartig verteilt. Das MCC besitzt eine spezifische Zusammensetzung und eine besondere Struktur, die sich im Elektronenmikroskop als Furchen-ähnliche Einstülpungen darstellen (Malinska *et al.*, 2003, 2004; Stradalova *et al.*, 2009; Loibl *et al.*, 2010). Unterhalb des MCC wurden stabile zytosolische Proteinstrukturen, die Eisosomen, identifiziert, von welchen vermutet wird, dass sie mit der Initiation der Endozytose in Zusammenhang stehen (Walther *et al.*, 2006; Grossmann *et al.*, 2008; Fröhlich *et al.*, 2009). Die Deletion der Eisosomenkomponente Pil1p führt zu einer verlangsamten Endozytose des Farbstoffs FM4-64 sowie des α -Faktor-Rezeptors Ste3p. Grossmann *et al.* hingegen konnten eine beschleunigte Internalisierung der Membranproteine Fur4p und Can1p in einer $\Delta pil1$ - oder $\Delta nce102$ -Mutante beobachten und lokalisierten klassische Endozytosemarker außerhalb der MCC (Grossmann *et al.*, 2008). Nce102p ist als integrales Membranprotein ein Bestandteil der MCC und an der Eisosomen-Ausbildung beteiligt, indem es abhängig von der Plasmamembranzusammensetzung Pil1p reguliert (Luo *et al.*, 2008; Fröhlich *et al.*, 2009). Die quantitative Analyse der Endozytoserate der Arginin-Permease Can1p ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen wildtypischen und $\Delta pil1$ -Zellen, die keine MCC-„patch“-Strukturen ausbilden. Außerdem korreliert die Kinetik, welche das Verschwinden der Permease aus dem MCC beschreibt, nicht mit deren Endozytoserate. Da auch das Plasmamembran-Signal von Can1-GFP bei Induktion der Endozytose durch Arginin-Zugabe sowohl in MCC als auch in MCP gleichmäßig abnahm, scheint die Endozytose unabhängig von der Organisation der Plasmamembran-Domänen reguliert zu werden. Dass kein vesikulärer Transport innerhalb der MCC festgestellt wurde, kann durch eine sterische Hinderung durch die Membran-gebundenen Eisosomenproteine bedingt sein, wodurch die Assemblierung der Endozytose-Maschinerie verhindert wird (Brach *et al.*, 2011). Vor diesem Hintergrund ist es nicht erstaunlich, dass sowohl die Deletion von *NCE102* als auch von *PIL1*, wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt, keinen Effekt auf die K28-Sensitivität ausübt.

Ähnlich wie Can1p, Tat2p oder Fur4p scheint die Endozytoserate des K28-Rezeptors Erd2p durch andere Mechanismen, welche unabhängig von der Struktur der Plasmamembran-Domänen agieren, reguliert zu werden (Beck *et al.*, 1999; Galan *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2008; Nikko *et al.*, 2008). Darunter fällt eine als „PURE-Pathway“ beschriebene Abfolge von Prozessen, welche die Phosphorylierung und Ubiquitinierung, die Cargo-Erkennung („Recognition“) und Endozytose beinhalten. Der α -Faktor-Transporter Ste6p, die Pheromon-Rezeptoren Ste2p und Ste3p sowie die Uracil-Permease Fur4p werden durch diesen Mechanismus endozytiert (Kelm *et al.*, 2004; Hicke *et al.*, 1998; Roth & Davis, 1996; Marchal *et al.*, 1998).

Die als ersten Schritt beschriebene Phosphorylierung stellt eine Voraussetzung zur Ubiquitinierung dar und ist am Beispiel von Ste2p beschrieben worden: Die Bindung des α -Faktors, der Ligand von Ste2p, ruft eine Konformationsänderung des dritten intrazellulären Loops sowie der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors hervor (Bukusoglu & Jenness, 1996). Durch diese Konformationsänderung erhält die Kinase Zugang zum Rezeptor und phosphoryliert Ste2p. Die phosphorylierten Serinreste können entweder von der Ubiquitinierungsmaschinerie erkannt werden oder die Phosphorylierung induziert wiederum eine Konformationsänderung, so dass die zu ubiquitinierenden Lysinreste zugänglich werden (Hicke, 1999). Neuere Daten deuten eher auf die Phosphorylierung als eine Voraussetzung zur Interaktion des zu internalisierenden Membranproteins mit sog. ART-Proteinen („arrestin-related proteins“), die die Rekrutierung der Ubiquitinierungsmaschinerie vermitteln. Arrestine in Säugerzellen sind lösliche Proteine, die Konformationsänderungen von Rezeptoren und Phosphorylierungen erkennen; sie rekrutieren endozytotische Proteine, teilweise aber auch Ubiquitin-Ligasen (Shenoy *et al.*, 2008). Noch bevor der Rezeptor zu bestehenden Clathrin-Ansammlungen an der Plasmamembran transportiert wird, findet die Phosphorylierung statt. Diese stellt somit den Beginn einer Abfolge von koordinierten Prozessen zur endozytotischen Internalisierung dar (Toshima *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung kann dabei an Serinresten erfolgen, die innerhalb des Internalisierungssignals SINNDKSS liegen. Deren Substitution durch Alanin verlangsamte die Ste2p-Endozytoserate (Hicke *et al.*, 1998). Alternativ können auch Serinreste in Sequenzen, welche der PEST-Aminosäureabfolge ähneln, phosphoryliert werden. Beispiele dafür sind Fur4p, dessen PEST-Motiv im N-Terminus lokalisiert ist, und Ste3p mit einer C-terminalen PEST-Sequenz (Marchal *et al.*, 1998; Roth & Davis, 2000; Feng & Davis, 2000). Die Phosphorylierungsstellen, welche die Endozytose des Transporters Ste6p ermöglichen, konnten eindeutig bestimmt werden. Die Phosphorylierung zweier Aminosäuren ist die Voraussetzung zur Ubiquitinierung und Internalisierung von Ste6p. Dies konnte durch verschiedenste Versuchsansätze belegt werden, die neben der Fluoreszenzmikroskopie GFP-markierter Ste6p-Varianten auch den biochemischen Nachweis der Phosphorylierung beinhalteten (Kölling *et al.*, 2002; Kelm *et al.*, 2004). Die *in silico*-Analyse von Erd2p ergab

sieben potentielle Phosphorylierungsstellen, wobei eine im C-Terminus und damit in der Nähe der möglicherweise ubiquitinierten Lysinreste lokalisiert war. Der Austausch dieses Threoninrestes durch Alanin im Erd2p-C-Terminus führte zu einer reduzierten K28-Sensitivität (Dausend, 2010). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere Phosphorylierungsstellen außerhalb dieses Clusters im C-Terminus existieren und relevant für die Endozytose sind, was auch bei der Internalisierung von Ste2p festgestellt wurde (Howard *et al.*, 2002; Toshima *et al.*, 2009).

Die für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen, Yck1p und Yck2p sind funktionell redundante Homologe der Casein Kinase I, die eine von zwei Klassen weit verbreiteter cAMP- und Ca²⁺-unabhängiger Proteinkinasen im Säuger darstellt (Robinson *et al.*, 1992; Tuazon & Traugh, 1991). Sie phosphorylieren in der Hefe *S. cerevisiae* im Rahmen des „PURE-Pathway“ unter anderem die Plasmamembranproteine Jen1p, Ste6p und Ste2p. Wird dies verhindert, kommt es zu einer deutlich reduzierten Endozytoserate und einer Stabilisierung der Proteine an der Plasmamembran (Paiva *et al.*, 2009; Kelm *et al.*, 2004; Toshima *et al.*, 2009). Yck2p konnte ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert werden, wobei das Erscheinen innerhalb des zeitlichen Ablaufs der Endozytose mit der Enzymfunktion korreliert (Roth *et al.*, 2002; Toshima *et al.*, 2009). Da die Deletion beider Kinasen zu einem letalen Phänotyp führt, basieren die Untersuchungen auf einer temperatursensitiven Doppelmutante. Einen Effekt der Einzeldelationen der beiden Gene *YCK1* und *YCK2* auf die K28-Aufnahme konnte Heiligenstein (2008) bereits ausschließen. Aufgrund der Redundanz der Genprodukte wurde in der vorliegenden Arbeit der K28-Phänotyp einer Doppelmutante bei semi-restriktiver Temperatur bestimmt. Die Hypersensitivität dieses Stammes lässt sich auf Sekundäreffekte zurückführen, da die Kinasen an einer Reihe weiterer zellulärer Prozesse, einschließlich Morphogenese und Zytokinese, beteiligt sind (Robinson *et al.*, 1992, 1993). Daher gestaltet sich die Interpretation der Rolle von Yck1p und Yck2p bei der Endozytose im Allgemeinen schwierig, da diese Enzyme vermutlich in die Regulation der Endozytosemaschinerie selbst involviert sind (Marchal *et al.*, 2000).

Der zweite Schritt des „PURE-Pathway“ beinhaltet die Ubiquitinierung des zu endozytierenden Plasmamembranproteins. Die Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation, wobei kovalent Ubiquitin, ein hoch konserviertes Protein von 8 kDa, mit dem Substratprotein konjugiert wird. Der Prozess läuft in drei Schritten ab, die durch spezifische Enzyme katalysiert werden. Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) überträgt das Molekül auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2); die Ubiquitin-Ligase (E3) katalysiert schließlich die Bildung einer Peptidbindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und einem spezifischen internen Lysinrest des Zielproteins (Hershko & Ciechanover, 1998). Durch die Bindung weiterer Ubiquitin-Moleküle an Ubiquitin-eigene Lysinreste entstehen Polyubiquitinketten, welche bevorzugt über die Lysinreste 48 oder 63 des Ubiquitins verknüpft sind. Erstere dient als

Degradationssignal zum proteasomalen Proteinabbau (Hershko & Ciechanover, 1992). Über Lysin 63 verbundene Ubiquitinketten können hingegen vielfältige Interaktionen vermitteln, unter anderem mit der Maschinerie der Proteintranslation oder der DNA-Reparatur. Monoubiquitinierungen und die Möglichkeit der Deubiquitinierung durch entsprechende Enzyme tragen zur allgemeinen Bedeutung dieser Modifikation bei (Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Chen & Sun, 2009). Der erste Hinweis für eine Beteiligung der Ubiquitinierung an der Endozytose in *S. cerevisiae* gab eine ubiquitinierte Form des Ste6p-Transporters an der Plasmamembran, welche bei Endozytosedefekten akkumulierte (Kölling & Hollenberg, 1994). Ein Jahr zuvor wurde in Säugerzellen die Ubiquitinierung des PDGRF („platelet derived growth factor“) -Rezeptor beschrieben (Mori *et al.*, 1993). Durch die Ubiquitin-vermittelte Internalisierung und teilweise auch lysosomale Degradation wird die Funktion einer Reihe von Kanälen, ATPasen und Transportern reguliert (Miranda & Sorkin, 2007).

Die Ubiquitinierungsreaktion als Signal zur Endozytose in *S. cerevisiae* beginnt mit der Aktivität des E1-Enzyms Uba1p. Von den elf bekannten E2-Enzymen ist zumindest ein Mitglied der Ubc1p/Ubc4p/Ubc5p-Familie zur Ubiquitinierung notwendig, wohingegen vermutlich nur eine spezifische E3-Ligase, Rsp5p, Ubiquitin auf die Plasmamembranproteine überträgt (Hicke & Riezman, 1996; Morvan *et al.*, 2004). Rsp5p gehört zur Familie der HECT Ubiquitin-Ligasen, welche ein Zwischenprodukt durch eine kovalente Thioester-Bindung zwischen Ubiquitin und einem katalytischen Cysteinrest innerhalb der HECT-Domäne bilden (Scheffner *et al.*, 1995; Rotin & Kumar, 2009). Rsp5p ist der einzige Vertreter der Nedd4 („neural-precursor-cell-expressed, developmentally down-regulated“) -Ligase-Familie der Hefe, die an weiteren zellulären Prozessen wie der Regulation der Transkription oder die Sortierung von Cargo-Proteinen in MVB („multivesicular bodies“) beteiligt sind. Neben der HECT-Domäne am C-Terminus besitzt sie eine N-terminale Phospholipid-bindende Domäne und drei WW-Domänen, welche PY-Motive im Substratprotein erkennen (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2006; Sudol, 1996; Staub *et al.*, 1996; Harty *et al.*, 2000).

Die Beteiligung des E2-Enzyms Ubc4p und der Ubiquitin-Ligase Rsp5p sowie des deubiquitinierenden Enzyms Doa4p an der K28-Endozytose spricht für eine Ubiquitinierung des HDEL-Rezeptors Erd2p an der Plasmamembran. Eine direkte Interaktion zwischen Erd2p und dem E3-Enzym Rsp5p konnte ebenfalls bestätigt werden (Heiligenstein *et al.*, 2006; Dausend, 2010). Dies schließt jedoch nicht die Beteiligung von ART- oder weiteren Adapterproteinen aus, die PY-Motive besitzen, möglicherweise die Phosphorylierung des Cargo-Proteins erkennen und die Ubiquitin-Ligase Rsp5p rekrutieren, da in der Aminosäuresequenz von Erd2p keine PY-ähnlichen Signale identifiziert wurden (Nikko *et al.*, 2008; Toshima *et al.*, 2009). In Säugerzellen existieren ähnliche Adapterproteine, die Nedd4-Ligasen zu Plasmamembrantransportern dirigieren. Weiterhin wird auch die Internalisierung des Anthrax-Rezeptors durch Ubiquitinierung gesteuert, welche von Adapterproteinen, den

β -Arrestinen, abhängig (Foot *et al.*, 2008; Abrami *et al.*, 2010). Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Adapter-Proteinen in *S. cerevisiae* mit der Ubiquitinierung von Membranproteinen in Verbindung gebracht, die nicht nur bei der Endozytose, sondern auch dem Trafficking zum Golgi oder den MVB beteiligt sind (Sullivan *et al.*, 2007; Nikko *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Nikko & Pelham, 2009; Lauwers *et al.*, 2010). Ob Adapterproteine auch bei der Ubiquitinierung und damit der Endozytose und dem intrazellulären Transport des HDEL-Rezeptors Erd2p eine Rolle spielen, konnte bislang nicht eindeutig bestimmt werden. Wie aus dem Screening von entsprechenden Deletionsmutanten in der vorliegenden Arbeit sowie in der Dissertation von Dausend (2010) ersichtlich wurde, hatten Einzeldelationen keinen signifikanten Effekt auf die K28-Aufnahme. Obwohl einzelne spezifische ART-Proteine die Endozytose, die Sortierung in MVB und teilweise auch den Golgi-zu-Endosomen-Transport bestimmter Membrantransporter vermitteln, sind ihre Funktionen doch größtenteils redundant (Kaksonen *et al.*, 2005; Nikko & Pelham, 2009; Lauwers *et al.*, 2010). Daher wäre die Herstellung von Mehrfachdeletionsmutanten und die Bestimmung des K28-Phänotyps ein nächster Schritt, den Ablauf einer wahrscheinlichen Ubiquitinierung von Erd2p aufzuklären.

Vier potentielle Ubiquitinierungsstellen lokalisierte Dausend (2010) im C-Terminus des HDEL-Rezeptors. Die Substitution dieser Lysinreste mit Arginin hatte einen negativen Effekt auf die K28-Aufnahme, der in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden konnte. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf mehrere, teilweise redundante Mechanismen bei der Erkennung des HDEL-Rezeptors als zu endozytisches Membranprotein hin (Munn, 2001). Weiterhin änderte diese Mutation nicht die subzelluläre Verteilung einer GFP-markierten Rezeptorvariante. Entsprechende Lysin-Substitutionen in Ste2p oder Ste6p bewirkten eine deutlich veränderte Lokalisation, was auf eine Blockierung der Endozytose zurückgeführt wurde (Kelm *et al.*, 2004; Toshima *et al.*, 2009). Die mikroskopische Darstellung endozytotischer Vorgänge kann jedoch durch Signale interner Strukturen erschwert werden. Dies ist besonders bei Erd2-GFP der Fall ist, da der HDEL-Rezeptor hauptsächlich in Golgi und ER lokalisiert ist. Kaksonen *et al.* nutzten zur Visualisierung von Clathrin bei der Endozytose die TIRF („total internal reflection fluorescence“) -Mikroskopie, wodurch nur Moleküle im Bereich der Zelloberfläche nahe dem Deckglas angeregt werden und so die störende Hintergrundfluoreszenz vermieden wird (Kaksonen *et al.*, 2005; Steyer & Almers, 2001; Toomre & Manstein, 2001; Kaksonen *et al.*, 2006). Ein weiterer Vorteil der Methode ist die erhöhte Auflösung in z-Richtung und die Möglichkeit, Aufnahmen mit hoher Frequenz durchzuführen, um Bewegungen zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Technik die Auswirkung der Lysin-Substitution auf die Erd2-GFP Lokalisation adressiert. Allerdings zeigte eine Erd2 K/R-GFP-Variante auch im Zellrandbereich kein verändertes Fluoreszenzmuster. Die Analyse der Rezeptormobilität entspricht diesem Ergebnis, wonach die Lokalisation des HDEL-Rezeptors durch die Verhinderung der Ubiquitinierung des

C-Terminus nicht nachweisbar beeinflusst wird. Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Liganden wäre in diesem Fall eine sensitivere Methode, die Endozytose dieser HDEL-Rezeptorvariante zu visualisieren (Toshima *et al.*, 2006, 2009). Dadurch können keine Fluoreszenzsignale des Rezeptors im anterograden Weg zur Plasmamembran, sondern nur der Komplex aus fluoreszierendem Liganden und Erd2p während der Endozytose und dem retrograden Transport in die Analyse eingehen.

Die Bedeutung der einzelnen Lysinreste im C-Terminus von Erd2p für die Ubiquitin-vermittelte Endozytose sollte durch Einzelsubstitutionen von jeweils einem Lysinrest gegen Arginin adressiert werden. Liegen mehrere potentielle ubiquitinierte Lysinreste vor, können deren Funktionen redundant sein, so dass erst bei Mutation aller ein Phänotyp auftritt, was für Ste6p beschrieben wurde (Kelm *et al.*, 2004). Alternativ kann auch eine Präferenz für einen Lysinrest bestehen, bei dessen Mutation die Endozytose beeinträchtigt wird. Diese Situation ist während der Endozytose von Ste3p gegeben (Roth & Davis, 2000). Zwischen den vier Lysinresten im C-Terminus von Erd2p scheint ebenfalls eine Redundanz zu herrschen; einen signifikant veränderten K28-Phänotyp stellte sich nach keiner der Einzelsubstitutionen ein. Vor dem Hintergrund der erstmalig festgestellten K28-Sensitivität während der Expression von Erd2 K/R ist dies auch nicht zu erwarten. Die starken Abweichungen im Wachstum einzelner Klone eines Stammes wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals beobachtet. Dies könnte durch eine Mutation des genomischen *ERD2*-Gens eventuell umgangen werden, so dass keine „multi copy“ Plasmide zur Erd2p-Expression eingesetzt werden müssen (Townsend *et al.*, 1994). Allerdings blieben Versuche dazu aufgrund der Beschaffenheit des *ERD2*-Genlokus und benachbarter Gene erfolglos (Dausend, persönliche Mitteilung).

Eine Multi-Ubiquitinierung, bei der mehrere Lysinreste ubiquitiniert werden, scheint demnach nicht zur Erd2p-Endozytose notwendig zu sein. Die Ubiquitin-Ligase Rsp5p bildet vornehmlich Ubiquitinketten, welche über den Lysinrest 63 verbunden sind (Kee *et al.*, 2005; 2006). Dennoch reicht ein Ubiquitin-Monomer als Signal zur Endozytose aus, wie am Beispiel von Ste2p bestätigt wurde (Terrell *et al.*, 1998). K63-verknüpfte Ubiquitinketten sind eher für spätere Schritte der Endozytose, der Sortierung in MVB, entscheidend. Weiterhin können sie die Internalisierung im Vergleich zur Monoubiquitinierung beschleunigen (Lauwers *et al.*, 2009). Der Monocarboxylattransporter Jen1p ist eines der wenigen Beispiele, bei denen K63-Ubiquitinketten sowohl für die Endozytose als auch das weitere intrazelluläre Trafficking entscheidend sind (Paiva *et al.*, 2009). Entsprechend den Untersuchungen von Heiligenstein genügt bereits eine Monoubiquitinierung zur Erd2p-Internalisierung; wurde die Bildung von Ubiquitinketten durch Expression von Ub^{K48R} oder Ub^{K63R} unterbunden, konnte weiterhin die K28-Aufnahme nachgewiesen werden (Heiligenstein *et al.*, 2006). Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde in dieser Arbeit eine Erd2 K/R-Ubiquitin-Fusion exprimiert. Falls eine Monoubiquitinierung wie bei Ste2p, Ste3p oder Ste6p ausreichend ist, sollte diese Variante

eine im Vergleich zu Erd2 K/R erhöhte K28-Sensitivität aufweisen. Die verwendete Ubiquitinvariante besitzt keine Lysinreste sowie eine Deletion der beiden C-terminalen Glyzinreste, so dass eine weitere Konjugation verhindert wird (Roth & Davis, 2000; Kelm *et al.*, 2004). Trotz einer nachgewiesenen Funktionalität des Erd2p-Ubiquitin-Fusionsproteins war die K28-Sensitivität signifikant reduziert. Dieses Phänomen kann zum einen auf eine durch die permanente Ubiquitinierung sehr schnelle Endozytose und damit auch geringe Kopienzahl von Erd2p an der Plasmamembran zurückzuführen sein. Zum anderen kann die Mono-ubiquitinierung das intrazelluläre Trafficking des HDEL-Rezeptors beeinträchtigen, da keine Deubiquitinierung stattfinden kann, so dass die K28-Sensitivität ebenfalls vermindert ist (Kelm *et al.*, 2004). Fehlt das deubiquitinierende Enzym Doa4p, wurde sogar eine vollständige K28-Resistenz beschrieben (Heiligenstein, 2008). Erst eine subzelluläre Lokalisierung dieser Erd2p-Ubiquitin-Fusion kann Aufschluss über die Entstehung des beobachteten K28-Phänotyps geben.

Wie genau die Ubiquitinierung eines Plasmamembranproteins erkannt wird, kann bisher nicht eindeutig nachvollzogen werden. Endozytische Proteine mit „ubiquitin-interacting motifs“ (UIM) wie Ent1p und Ent2p sowie Ede1p, wobei letzteres eine C-terminale Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) besitzt, sind potentielle Kandidaten für eine Wechselwirkung mit ubiquitinierten Membranproteinen. Epsin 1, ein Säugerhomolog zu den Hefeproteinen Ent1p und Ent2p, konnte als Cargo-spezifischer Adapter für die Clathrin-vermittelte Endozytose des Influenza Virus identifiziert werden, wobei die Interaktion vermutlich über UIM erfolgt (Chen & Zhuang, 2008). Die in *S. cerevisiae* redundanten Epsine Ent1p und Ent2p besitzen Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat-Interaktionsdomänen, ENTH („epsin N-terminal homology“) Domänen genannt, die die Rekrutierung zur Plasmamembran ermöglichen und eine Krümmung der Plasmamembran induzieren (Wendland *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2003; Ford *et al.*, 2002). Alle drei Proteine vermitteln zusammen die Rekrutierung des ubiquitinierten Rezeptors zu „Clathrin coated pits“ (Toshima *et al.*, 2009).

Ein ähnlicher Mechanismus scheint auch bei der Endozytose des HDEL-Rezeptors involviert, da die Beteiligung von Ede1p an der K28-Internalisierung nachgewiesen werden konnte. Diese Proteine gehören zusammen mit den Adaptern YAP1801/2 zu den ersten, die an der Endozytose-Stelle identifiziert wurden (Newpher *et al.*, 2005; Toshima *et al.*, 2006; Kaksonen *et al.*, 2005). Die Clathrin-Adapter YAP1801/2 agieren Cargo-spezifisch: Bisher zeigte nur Snc1p einen Endozytose-Defekt in einer *yap1801yap1802*-Doppelmutante (Burston *et al.*, 2009). Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervorgeht, hatte die betreffende Deletion keinen Einfluss auf die K28-Internalisierung.

Darüber hinaus sind weitere Cargo-spezifische Adapter bekannt, welche die zu endozytierenden Proteine mit der Clathrin-Hülle verbinden (Conibear, 2010). Dazu zählt Syp1p, das jedoch nicht an der K28-Aufnahme beteiligt zu sein scheint oder dessen Phänotyp eventuell durch funktionelle Homologe maskiert wird (Reider *et al.*, 2009; Stimpson *et al.*, 2009; Boettner *et al.*, 2009).

Das Protein Sla1p ist ein Bestandteil des Pan1-Komplexes und kann ebenfalls als Adapter fungieren. Dieser Komplex, welcher noch End3p beinhaltet, erscheint etwas zeitverzögert an der Endozytosestelle, wenn Ede1p verschwindet und Proteine, welche die Aktinpolymerisation aktivieren, rekrutiert werden (Kaksonen *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2000). Der Pan1-Komplex verbindet das Cargo-Protein sowohl mit Clathrin als auch mit Aktin und kann dessen Polymerisation initiieren (Duncan *et al.*, 2001). Die Interaktion wird durch die SHD1-Domäne des Proteins Sla1p und einem NPF_(1,2)D-Motiv des Cargo-Proteins vermittelt (Howard *et al.*, 2002; Piao *et al.*, 2007). Di Pietro *et al.* identifizierten kürzlich innerhalb der Sla1p-Aminosäuresequenz eine Clathrin-Box, über welche die Verbindung zum Clathrin-Gerüst hergestellt wird (Di Pietro *et al.*, 2010). Die SH3-Domänen von Sla1p sind für die korrekte Ausbildung des kortikalen Aktinzytoskeletts entscheidend und können zumindest *in vitro* auch Ubiquitin binden (Holtzman *et al.*, 1993; Ayscough *et al.*, 1999; Stamenova *et al.*, 2007). Die vollständige Deletion des *SLA1*-Gens hatte eine K28-Resistenz zur Folge, wohingegen die Deletion der SHD1-Domäne, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu einer verminderten Toxinaufnahme führt. Dieser Phänotyp entspricht einer Erd2p-Variante, deren N-terminales NPF-Motiv deletiert wurde (Dausend, 2010). Die genaue Aminosäureabfolge im N-Terminus von Erd2p lautet NPFRLIGD und stimmt damit nicht exakt mit den beschriebenen Motiven überein. Der deutliche K28-Phänotyp einer *sla1Δshd1* Mutante deutet jedoch auf eine Relevanz dieses Motivs für die Erd2p-Internalisierung hin, da Sla1p trotz dieser Deletion seine Funktion in der Ubiquitin-vermittelten Endozytose aufrecht erhält (Howard *et al.*, 2002; Piao *et al.*, 2007). Durch weitere Mutagenesen, welche den Asparaginsäurerest an der Position acht mit einschließen sollten, könnte die Bedeutung dieses Motivs weiter untermauert werden. Das aus nur drei Aminosäuren bestehende Signal NPF wird von EH-Domänen erkannt, welche eine Vielzahl endozytotischer Proteine, darunter Ede1p, End3p und Pan1p besitzen. Entsprechend ist das NPF-Motiv unter endozytotischen Proteinen weit verbreitet, darunter Ent1p und YAP1801/2 (siehe oben; Salcini *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2003).

Diese Interaktionsmöglichkeiten stellen die vielschichtige Vernetzung der endozytotischen Prozesse heraus. Noch komplexer wird das System durch einen weiteren Adapter, der bisher nur in mehrzelligen Organismen mit der Endozytose in Verbindung gebracht wurde. Heiligenstein (2008) erhielt durch ein Screening von Deletionsmutanten Hinweise auf die Beteiligung des AP-2 Komplexes an der K28-Aufnahme durch *S. cerevisiae*; auch durch

Transposon-Mutagenese konnten Komponenten des AP-2 Komplexes mit Einfluss auf die K28-Toxizität identifiziert werden (Sendzik, 2006). Der heterotetramere Komplex stellt in höheren eukaryotischen Zellen eine Verbindung zwischen dem zu endozytierenden Membranprotein und der Clathrin-Hülle her. Weiterhin rekrutiert er akzessorische und regulatorische Proteine wie Epsine oder auch Amphiphysin (Pearse *et al.*, 2000). In Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* ist der AP-2 Komplex essentiell für deren Lebensfähigkeit (Gonzalez-Gaitan *et al.*, 1997; Shim & Lee, 2000; Mitsunari *et al.*, 2005). Der AP-2 Komplex ist jedoch nicht zwangsläufig an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt, da auch in Säugerzellen alternative Adapter mit ähnlicher Sortierungs- und Assemblierungsfunktion existieren (Traub, 2003). Ein AP-2 „knock-down“ beeinträchtigte beispielsweise nicht die Aufnahme der EGF- oder LDL-Rezeptoren (Motley *et al.*, 2003).

In *S. cerevisiae* wurden Orthologe zu den drei Adapter-Komplexen der Säugerzellen identifiziert (Yeung *et al.*, 1999). Der AP-1 Komplex vermittelt den Clathrin-abhängigen Transport zwischen *trans*-Golgi-Netzwerk und den Endosomen, der AP-3 Komplex ist in den Clathrin-unabhängigen Transport von Membranproteinen aus dem Golgi-Apparat zur Vakuole involviert (Anand *et al.*, 2009). In Bezug auf die Funktion des AP-2 Komplexes wurde bisher eine Beteiligung an der Endozytose in *S. cerevisiae* ausgeschlossen. Die Rekrutierung von Clathrin und der Clathrin-vermittelte Transport in Hefezellen werden vermutlich nicht von Komponenten dieses heterotetrameren Komplexes gesteuert (Huang *et al.*, 1999). Die Deletion einzelner Untereinheiten dieses Komplexes ist nicht letal, führte aber zu einer Resistenz gegen das Killertoxin K28 und damit zu dem ersten spezifischen Phänotyp einer AP-2 „loss-of-function“-Mutation in *S. cerevisiae* (Burston *et al.*, 2009; Conibear, 2010). Die Deletion einer Untereinheit verhindert die Wechselwirkungen der restlichen Komponenten, da ähnlich der Situation in Säugerzellen, alle vier Untereinheiten in funktioneller Form vorhanden sein müssen, um den Komplex ausbilden zu können (Yeung *et al.*, 1999). Entsprechend führte die Deletion einer Untereinheit zu einer Fehllokalisierung der restlichen Komponenten. Mit Hilfe GFP-markierter Untereinheiten wurde die Lokalisation des Komplexes in Hefezellen bestimmt und den Endozytosestellen zugeordnet. Ihre Lebenszeit entsprach der anderer früher endozytotischer Proteine wie Ede1p. Durch die Kolo-kalisation mit weiteren endozytotischen Proteinen konnte die Internalisierung verfolgt werden (Carroll *et al.*, 2009). Der AP-2 Komplex übt folglich seine Funktion bereits in einem frühen Stadium der Endozytose aus und wird zeitgleich mit Sla1p internalisiert. Dies entspricht auch dem Ablauf in Säugerzellen, wo AP-2 den neu gebildeten Clathrin-Ansammlungen zugeordnet werden konnte und ein dem Ede1p-Ortholog Eps15 ähnliches Rekrutierungsprofil zeigte (Gagny *et al.*, 2000; Ehrlich *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2011).

Einen direkten Einfluss des AP-2 Komplexes auf die Funktion der Endozytose-Maschinerie im Allgemeinen konnte jedoch nicht bestätigt werden; die Lokalisation und Lebenszeit von Sla1-GFP blieb auch nach Deletion von AP-2 Komponenten unverändert. Außerdem war weder die Aufnahme des lipophilen Farbstoffs FM4-64 noch des α -Faktors von der Deletion betroffen (Carroll *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit gelang es, die Funktion des AP-2 Komplexes bei der K28-Aufnahme zu spezifizieren: Die Einzeldelationen der vier Untereinheiten führten zu einer vollständigen K28-Resistenz. Wie Zellfraktionierungsstudien belegen, kommt es in den entsprechenden Mutanten nicht zu einer Akkumulation des Toxins im Zytosol, wie es bei wildtypischen Zellen oder Deletionsmutanten mit Defekten der Komplexe AP-1 oder AP-3 zu beobachten war. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Phänotyp einer $\Delta end3$ -Mutante; auch in diesem Fall akkumulierte K28 nicht im Zytosol (Eisfeld *et al.*, 2000). Diese Mutante weist sowohl eine defekte Internalisierung des α -Faktors als auch des Farbstoffs Lucifer Yellow auf (Raths *et al.*, 1993).

Eine Beteiligung des AP-2 Komplexes an der K28-Internalisierung wurde in dieser Arbeit außerdem durch indirekte Toxinaufnahmestudien belegt; die K28-Menge im Überstand von Sphäroplasten blieb dabei im Gegensatz zum Wildtyp im Zeitverlauf konstant. Ähnlich der Deletion von *END3* verhindert ein defekter AP-2 Komplex folglich die K28-Internalisierung. Dies sollte auch Auswirkungen auf die Lokalisation und Dynamik des K28-Rezeptors Erd2p haben. Allerdings ergaben sich hinsichtlich der subzellulären Verteilung als auch der Mobilität von Erd2-GFP keine Unterschiede zwischen wildtypischen Hefezellen und AP-2-Deletionsmutanten. Hier bestätigt sich eher der von Carroll *et al.* festgestellte fehlende Einfluss des AP-2 Komplexes auf die Endozytosemaschinerie im Allgemeinen (Carroll *et al.*, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle mitgeführte $\Delta end3$ -Mutante hingegen wies eine deutlich reduzierte Mobilität der Erd2-GFP Foci auf. Auch die Verweildauer im Bereich der Plasmamembran war im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht.

Die Auswirkungen der Deletion von *END3* auf die Endozytose wurden von Kaksonen *et al.* (2005) ebenfalls mittels TIRF-Mikroskopie eingehend analysiert. Sla1-GFP ist in diesen Zellen größtenteils zytoplasmatisch und kaum an kortikalen Clathrin-Ansammlungen lokalisiert (Warren *et al.*, 2002). Im Vergleich zum Wildtyp konnte eine verstärkte Akkumulation von Clathrin im Zellkortex beobachtet werden (Newpher *et al.*, 2005). Auch die Lebenszeit von Pan1p, fusioniert mit GFP war stark erhöht (Kaksonen *et al.*, 2005). Wie am Beispiel dieser endozytotischen Proteine deutlich wird, hat die Deletion von *END3* drastische Auswirkungen auf die Endozytose.

Dass diese Effekte auch den HDEL-Rezeptor Erd2p betreffen, spricht wiederum für dessen endozytotische Internalisierung. Die Analyse der Vesikelmobilität und -verweildauer mit der in dieser Arbeit angewendeten, ursprünglich für die Untersuchung der Exozytose in Säugerzellen konzipierten Methode, kann somit auch in Hefezellen zum Einsatz kommen, so dass eine

exakte Bestimmung der Mobilität eines fluoreszenzmarkierten Proteins möglich wird. Diese beruht auf der Ermittlung eines quantitativen Maßes für dynamische Veränderungen der Vesikelmobilität, dem „caging diameter“ (Nofal *et al.*, 2007).

Den Untereinheiten des AP-2 Komplexes können verschiedene Funktionen zugeordnet werden. Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\mu 2$ -Untereinheit binden Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat und positionieren so den Komplex an der Membran (Collins *et al.*, 2002). Dazu wird $\mu 2$ zunächst phosphoryliert, was die Membranbindung und die Wechselwirkung mit Cargo-Molekülen forciert (Olusanya *et al.*, 2001; Ricotta *et al.*, 2002; Höning *et al.*, 2005). Die Clathrinbindung wird durch die $\beta 2$ -Untereinheit vermittelt, die zusätzlich ebenso wie die α -Komponente akzessorische Proteine rekrutiert (Owen *et al.*, 2000; Brodsky *et al.*, 2001; Slepnev & De Camilli, 2000). Der σ -Untereinheit kommen primär strukturelle Aufgaben zu (Collins *et al.*, 2002). Die Interaktion mit zu endozytierenden Cargo-Proteinen wird je nach Interaktionsmotiv durch verschiedene Untereinheiten hergestellt (Traub, 2009). So erkennt die $\mu 2$ -Untereinheit das Motiv YXX \emptyset (\emptyset : hydrophobe Aminosäure (Leu, Met, Ile, Phe oder Val), X: beliebige Aminosäure; Ohno *et al.*, 1995). Die weiteren Endozytose-Signale wie [DE]XXXL[LI] oder II, die von AP-2 Komponenten erkannt werden, konnten nicht in zytosolischen Bereichen des HDEL-Rezeptors Erd2p identifiziert werden. In der Aminosäuresequenz des KDEL-Rezeptors im Säuger sind bisher keine potentiellen Endozytose-motive beschrieben worden. Bekannt ist, dass bestimmte Regionen für die Interaktion mit Liganden essentiell sind (Singh *et al.*, 1993; Lewis & Pelham, 1992; Janson *et al.*, 1998; Scheel & Pelham, 1998). Außerdem hat der C-Terminus sowohl des HDEL- als auch des KDEL-Rezeptors essentielle Funktionen, für letzteren wurde unter anderem die Beteiligung an der Ausbildung von COP I-Vesikeln nachgewiesen (Cabrera *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002; Semenza *et al.*, 1990). Zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne in einem zytosolischen Loop des HDEL-Rezeptors der Hefe befindet sich jedoch eine YNEM-Sequenz, welche als Interaktionsmotiv für die $\mu 2$ -Untereinheit des AP-2 Komplexes dienen könnte. Voraussetzung hierfür ist ein Abstand von mindestens sieben Aminosäuren von der zytosolischen Seite der Plasmamembran, welche bei Erd2p gegeben ist (Collawn *et al.*, 1990). Eine in dieser Arbeit adressierte Kolo-kalisation von fluoreszenzmarkiertem Erd2p und einer $\mu 2$ -GFP-Fusion scheiterte jedoch aufgrund von schwachen Fluoreszenzsignalen bzw. einer Fehllokalisation der Fusionsproteine, obwohl deren Funktionalität bestätigt werden konnte.

Bar *et al.* (2009) verwendeten das BiFC („Bimolecluar fluorescence complementation“) -Assay, um eine Interaktion der $\mu 2$ -Untereinheit des AP-2 Komplexes und einem zu endozytierenden Rezeptor in Pflanzen nachzuweisen. Eine auf der Rekonstitution von mCherry-basierende Variante dieses Systems konnte auch zur Darstellung von Proteinwechselwirkungen in *S. cerevisiae* etabliert werden (Fan *et al.*, 2008; Schäuble, 2008). Das BiFC-Assay ist ebenfalls zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Membranproteinen und löslichen zytosolischen

Proteinen einsetzbar, da es eine Wechselwirkung zwischen Erd2p und der Ubiquitin-Ligase Rsp5p aufzeigte (Dausend, 2010). Obwohl in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis einer Interaktion zwischen Erd2p und der μ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes alle möglichen Kombinationen aus mCherry-Fragmenten und Beute- oder Fängerprotein getestet wurden und auch deren Funktionalität bestätigt werden konnte, ergab die Fluoreszenz-Mikroskopie kein eindeutiges Ergebnis. Aufgrund der teils starken Fluoreszenz der Negativkontrolle und weniger vitaler Zellen wäre eine FACS-Analyse mit einem zur Anregungswellenlänge von mCherry passenden Laser, verbunden mit einer statistischen Auswertung, notwendig.

Eine weitere Möglichkeit, im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen dem AP-2 Komplex und dem HDEL-Rezeptor nachzuweisen, bestand in der gezielten Mutagenese des potentiellen Interaktionsmotivs YNEM zu ANEA. Ein entsprechender Aminosäureaustausch, bei dem sowohl der aromatische als auch der hydrophobe Aminosäurerest im μ 2-Interaktionsmotiv des Transferrin-Rezeptors durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt wurden, resultierte in einer nur noch 15%igen Eisenaufnahme (Collawn *et al.*, 1990). Dass die Auswirkungen einer analogen Mutation des YXX \emptyset -Motivs auf die K28-Aufnahme durch den HDEL-Rezeptor nicht einen solchen Effekt verursachten, könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass die YNEM-Sequenz nicht in die Erd2p-AP-2 Interaktion involviert ist. Unter den bislang bekannten Variationen des YXX \emptyset -Motivs ist diese Aminosäureabfolge nicht zu finden, was die Frage nach einem alternativen Interaktionssignal aufwirft (Traub, 2009). Allerdings berichteten Bonifacino und Traub, dass eine Interaktion auch möglich ist, wenn die beiden internen Aminosäuren des Motivs als suboptimal eingestuft wurden (Bonifacino & Traub, 2003). Ein Methionin als vierte Aminosäure im YXX \emptyset -Signal, welche auch im Motiv des HDEL-Rezeptors zu finden ist, beinhaltet die Internalisierungssequenz von CTLA-4 („T cell costimulatory receptor“). Dessen YVKM-Motiv bindet μ 2 und vermittelt die schnelle Endozytose des Proteins in T-Zellen (Shiratori *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1997). Zudem führte die Mutagenese des YXX \emptyset -Interaktionsmotivs der μ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes nicht zu einer vollständigen Hemmung der Endozytose, was am Beispiel der Transferrin-Internalisierung belegt wurde und eventuell durch eine verbleibende schwache Bindung zwischen μ 2 und dem Transferrinrezeptor erklärt werden kann (Motley *et al.*, 2006). Darüberhinaus kann die Interaktion zwischen dem zu internalisierenden Cargo und dem AP-2 Komplex auch durch einen zusätzlichen Adapter vermittelt werden, der selbst keine Clathrin-Bindestelle besitzt (Kozik *et al.*, 2010; Hutterer & Knoblich, 2005).

Des Weiteren könnte eine gewisse Redundanz zwischen verschiedenen endozytotischen Mechanismen vorliegen, die einen eventuellen Phänotyp überdeckt. Potentielle Adapter bei der Endozytose des HDEL-Rezeptors sind neben dem AP-2 Komplex, der eventuell mit der YNEM-Sequenz in Erd2p interagiert, auch das Protein Sla1p, welches durch seine SHD1-Domäne vermutlich mit dem NPF $X_{(1,2)}$ D-ähnlichen Motiv im N-Terminus des HDEL-Rezeptors

wechselwirkt, und Epsine, die möglicherweise die Ubiquitinierung im C-Terminus des Rezeptors Erd2p erkennen. Die Endozytose des Erd2p/K28-Rezeptor/Liganden-Komplexes könnte durch diese drei Internalisierungsmechanismen reguliert werden (Abb. 76). Auch für weitere Plasmamembranproteine der Hefe wurden mehrere unabhängige Internalisierungssignale postuliert (Munn, 2001). Das gleiche Phänomen trifft auf die Clathrin-vermittelte Endozytose des EGF („epidermal growth factor“) -Rezeptors in Säugerzellen zu; ein Prozess, der durch mindestens vier vollständig redundante oder teilweise zusammenwirkende Internalisierungsmechanismen, darunter auch die Ubiquitinierung sowie die Wechselwirkung mit dem AP-2 Komplex, reguliert wird (Goh *et al.*, 2010). Ein Screening nach Endozytosemotiven ergab, dass viele humane Transmembranproteine mehr als eines dieser Signale besitzen. Dieser Umstand kann für die Feinabstimmung der Internalisierungsrate und der Koordination zwischen Endozytose und intrazellulärem Transport von Bedeutung sein (Kozik *et al.*, 2010).

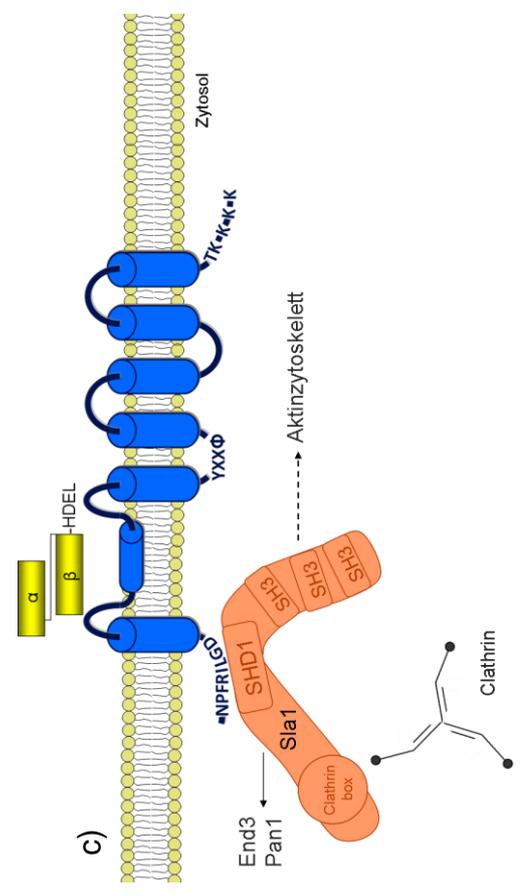
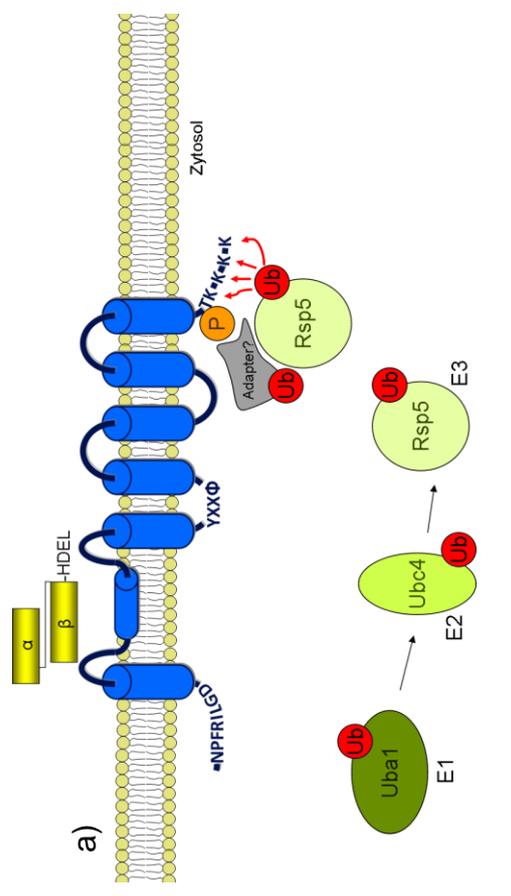
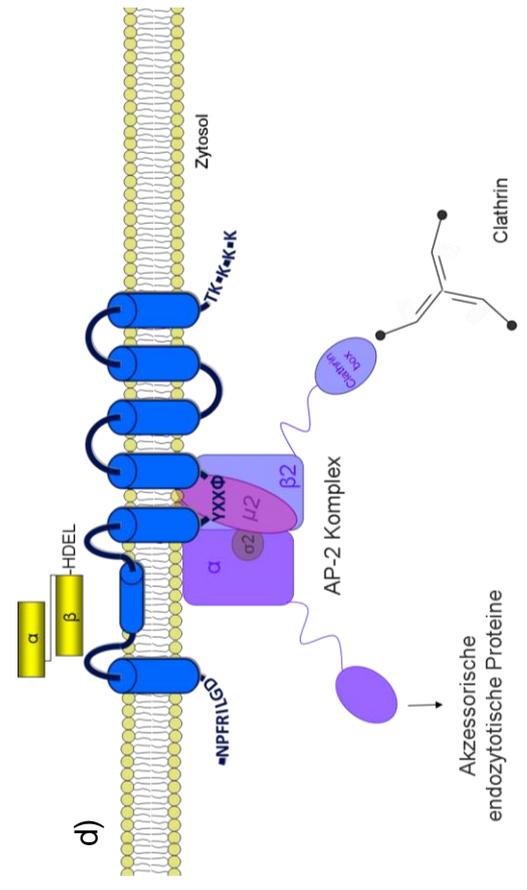
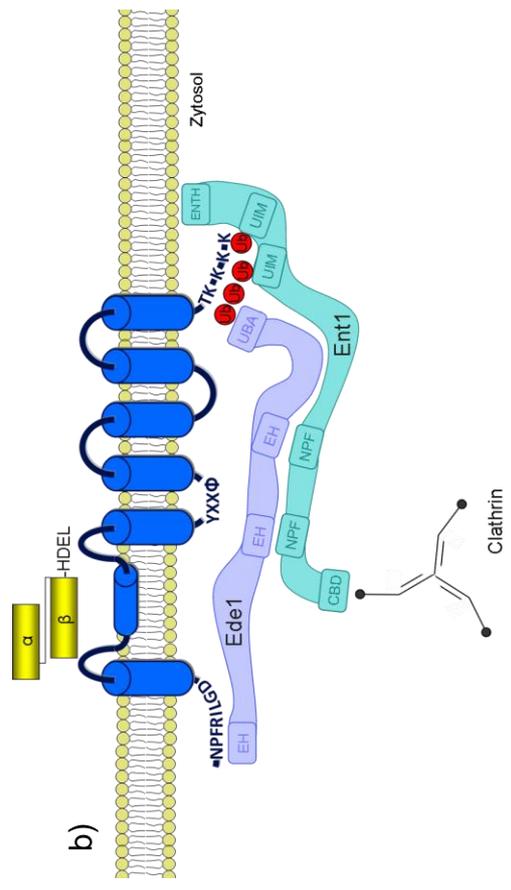


Abb. 76: Modelle möglicher Mechanismen der Erkennung des K28-Rezeptors Erd2p zur endozytotischen Internalisierung. **a) Ubiquitinierung:** Nach der durch Ligandenbindung verursachten Konformationsänderung des Rezeptors erfolgt die Phosphorylierung, welche von Adapterproteinen, möglicherweise der ART-Familie, erkannt wird. Diese vermitteln die Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Rsp5p, wobei Ubiquitin zuerst durch Uba1p (E1) aktiviert und durch Ubc4p (E2) auf die Ubiquitin-Ligase Rsp5p (E3) übertragen werden muss (verändert nach Heiligenstein *et al.*, 2006). **b) Erkennung der Ubiquitinierung und der NPF-Sequenz durch die Adapterproteine Ede1p und Ent1p:** Die Ubiquitinierung wird durch Ent1p mittels Ubiquitin-Interaktions-Motiven (UIM) sowie Ede1p durch die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) erkannt. Zusätzlich stabilisieren Wechselwirkungen zwischen EH-Domänen der Adapterproteine und NPF-Motiven, welche auch im N-Terminus von Erd2p vorkommen, den Komplex. Die Verbindung zum Clathrin-Gerüst wird durch die Clathrin-Binde-Domäne von Ent1p, zur Plasmamembran durch die Phosphatidylinositolphosphat-bindende ENTH-Domäne von Ent1p hergestellt (verändert nach Aguilar *et al.*, 2003). **c) Erkennung des NPFRLGD-Motivs durch Sla1p:** Durch SHD1-vermittelte Interaktion zwischen der Pan1-Komplex-Komponente Sla1p und dem NPF_{X(1,2)D}-ähnlichen Motiv im N-Terminus des K28-Rezeptors wird die Verbindung zur Clathrin-Hülle über die Clathrin-Box von Sla1p gebildet. SH3-Domänen von Sla1p stellen die Verbindung zum Aktinzyktoskelett her (verändert nach Howard *et al.*, 2002; Di Pietro *et al.*, 2010). **d) Erkennung des YNEM-Signals durch den AP-2 Komplex:** Die μ 2-Untereinheit des heterotetrameren Komplexes kann das YXX \emptyset -Motiv in einem zytosolischen Loop des HDEL-Rezeptors erkennen und über die β 2-Untereinheit Clathrin sowie durch die α -Untereinheit weitere akzessorische endozytotische Proteine rekrutieren. Sowohl μ 2 als auch α binden an Phosphatidylinositolphosphat der Plasmamembran (verändert nach Pearse *et al.*, 2000; Traub, 2009).

Neben der Erkennung des Cargo-Proteins gehört zu den Aufgaben der Adapterproteine auch die Herstellung einer Verbindung zur der sich bildenden Clathrin-Hülle. Bei der Endozytose in *S. cerevisiae* nimmt das Strukturprotein, welches ein Heterohexamer in einer Trisektion-Struktur aus je drei leichten und schweren Ketten aufbaut, keine essentielle Rolle ein. Die Endozytose ist in Clathrinmutanten nur um 50 % reduziert (Young, 2007; Chu *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 1988). Die Deletion von *CHC1*, kodierend für die schwere Kette, reduzierte die K28-Sensitivität und hatte einen starken Einfluss auf die Lokalisation des K28-Sekundärrezeptors, da eine Erd2-GFP-Fusion in der vorliegenden Arbeit nicht mehr im Zellrandbereich detektiert werden konnte. Ebenso konnten Kaksonen *et al.* eine um über 80 % verminderte Zelloberflächenlokalisation des endozytotischen Proteins Sla1p, fusioniert an GFP, in einer $\Delta chc1$ -Mutante feststellen (Kaksonen *et al.*, 2005). Dies bestätigt wiederum den HDEL-Rezeptor Erd2p als ein Membranprotein, welches endozytiert wird.

Die Internalisierung des endozytotischen Vesikels wird durch die Aktinpolymerisation und die Myosin-Motoraktivität vorangetrieben (Sun *et al.*, 2006). Burston *et al.* (2009) identifizierten eine neue Komponente der Endozytose-Maschinerie, Ldb17p, die bei der Regulierung der Aktinassemblierung involviert ist. Dies erfolgt Cargo-unabhängig, vermutlich durch Herstellung einer Verbindung zwischen Sla1p und dem Arp2/3-Komplex, der die Aktinassemblierung reguliert. Im Gegensatz zur Deletion einer Reihe von Genen, deren Produkte ebenfalls an diesem Schritt der Endozytose beteiligt sind, konnte in dieser Arbeit die K28-Resistenz einer $\Delta ldb17$ -Mutante festgestellt werden. Aufgrund der funktionellen Redundanz zwischen zahlreichen endozytotischen Proteinen kann nur durch die Analyse der Einzeldelationen eine Beteiligung der Proteine an der Internalisierung des Toxins nicht eindeutig bestimmt werden (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003). Ein Beispiel sind die „Actin-capping“ Proteine Cap1p und

Cap2p, welche einen heterodimeren Komplex bilden und neben Sac6p zur Dynamik des Aktinnetzwerks beitragen (Kim *et al.*, 2004). Das Aktin-quervernetzende Protein Sac6p ist essentiell zur K28-Endozytose, eine Deletion des entsprechenden Gens resultiert in einer K28-Resistenz. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, ist die Mobilität des K28-Rezeptors Erd2p in einer solchen Deletionsmutante jedoch nicht beeinträchtigt. Die Deletion von SAC6 beeinflusst das Zellwachstum und führt zu Defekten der α -Faktor-Endozytose (Adams *et al.*, 1991; Drubin *et al.*, 1988; Kübler & Riezman, 1993). Auch die Einwärtsbewegung endozytotischer Proteine wie Sla1p ist in diesen Mutanten vollständig aufgehoben, woraus gefolgert wurde, dass die Quervernetzung der Aktinfilamente essentiell zum Kraftaufbau zur Vesikel-Internalisierung ist (Kaksonen *et al.*, 2005). Dass die Deletion des Hefe-Fimbrins SAC6 keinen Einfluss auf die Erd2p-Mobilität ausübte, kann auf die Existenz eines weiteren Aktin-bündelnden Proteins in Hefezellen zurückgeführt werden: Scp1p ist ebenfalls in kortikalen Aktin-Patches lokalisiert und besitzt eine mit Sac6p überlappende Funktion (Goodman *et al.*, 2003; Winder *et al.*, 2003). In Abwesenheit von SAC6 stieg die Scp1p-Menge um 50 % an, was einem kompensatorischen Mechanismus gleichkommt. Erst die Deletion beider Gene erhöhte deutlich die Lebenszeit endozytotischer Patches und führte auch zu nachweisbaren Defekten der „fluid phase“ Endozytose (Gheorghe *et al.*, 2008; Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009).

Zur Internalisierung werden die Amphiphysine Rvs161p und Rvs167p zur Endozytosestelle rekrutiert (Sivadon *et al.*, 1995; Kaksonen *et al.*, 2005). Auch in Säugerzellen tragen diese Proteine zur Tubulus-Ausbildung bei der Vesikelabschnürung bei, da sie BAR Domänen besitzen, die an Membranen binden und deren Krümmung induzieren (Takei *et al.*, 1999; Peter *et al.*, 2004). Rvs161p und Rvs167p bilden dazu ein Heterodimer; folglich sind beide Proteine zur vollständigen Funktionalität notwendig. Die Deletion von *RVS161* oder *RVS167* blockiert sowohl die Rezeptor-vermittelte als auch die „fluid phase“ Endozytose (Munn *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998; Colwill *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2006). Durch die Deletion findet zwar weiterhin eine Membraneinstülpung statt, die jedoch vermutlich durch die fehlende Vesikelabschnürung unterbrochen wird (Kaksonen *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit war die K28-Sensitivität einer $\Delta rvs167$ Mutante deutlich vermindert, allerdings zeigte die Mobilitätsanalyse des K28-Rezeptors Erd2p vor einem entsprechenden Stammhintergrund keine Abweichungen vom Wildtyp. Im Einklang mit diesem Ergebnis steht die Beobachtung, dass auch ohne Amphiphysine eine, wenn auch verlangsamte, Vesikelabschnürung stattfinden kann und nur ein Viertel der Endozytosestellen betroffen sind. Demzufolge sind vermutlich weitere Proteine an diesem Prozess beteiligt, darunter Myosin (Kaksonen *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2009; Jonsdottir & Li, 2004; Stefan *et al.*, 2005; Idrissi *et al.*, 2008).

Die in dieser Arbeit etablierte Mobilitätsanalyse von Erd2-GFP zeigte nur in einer $\Delta end3$ -Mutante Unterschiede zur wildtypischen Beweglichkeit. Auch die Inkubation mit dem Liganden K28 hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Mobilität des HDEL-Rezeptors. Somit scheint sich die mit dieser Methode bestimmte Beweglichkeit des Rezeptors nur bei starken endozytotischen Defekten wie einer Deletion von *END3* signifikant zu verändern. Die Deletion von *SAC6* oder *RVS167* sowie die Mutation des Erd2p-eigenen Lysinclusters führten nicht zu einer nachweisbaren Mobilitätsänderung. Dabei ist zu beachten, dass im Gegensatz zur Visualisierung der Endozytose von Pheromon-Rezeptoren, der K28-Rezeptor nur in geringer Menge an der Plasmamembran kolokalisiert und hauptsächlich in Golgi und ER vorkommt, was die Fokussierung auf endozytotische Ereignisse erschwert.

Die Auflösung des Komplexes endozytotischer Proteine nach der Vesikelabschnürung wird durch Kinasen wie Ark1p und Prk1p induziert, welche durch das Aktin-Binde-Protein Abp1p rekrutiert werden. Die Phosphorylierung des Pan1-Komplexes beispielsweise führt zu dessen Dissoziation (Cope *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2001; Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2003). Aufgrund von Funktionsüberscheidungen konnte ein Einfluss der Deletion einzelner Kinase-Gene auf die K28-Sensitivität nicht adressiert werden. Der Abbau des Pan1-Komplexes unterliegt auch der Regulierung durch weitere Proteine wie Gts1p und Lsb5p, wobei die Einzeldelationen der entsprechenden Gene in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Effekt auf die K28-Sensitivität zeigten. Ebenso verhielt sich ein $\Delta inp52$ -Stamm; das Produkt des deletierten Gens reduziert durch Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-4-phosphat die Affinität von Endozytose-Proteinen für die Vesikelmembran, vor allem von Sla2p und Epsinen (Stefan *et al.*, 2005). Defekte entsprechender Deletionsmutanten konnten weder bei der Endozytose von FM4-64 oder dem α -Faktor nachgewiesen werden; sie manifestierten sich erst im Transport zur Vakuole (Toret *et al.*, 2008). Wie der K28-Transport nach Fusion von endozytiertem Vesikel und frühem Endosom, welche beide vermutlich mit Aktin assoziiert sind, fortgeführt wird, ist nicht genau bekannt (Huckaba *et al.*, 2004; Toshima *et al.*, 2006).

Der Toxintransport zum Golgi-Apparat scheint sowohl über das frühe als auch über das späte Endosom ablaufen zu können (Eisfeld, 2002; Heiligenstein, 2008). Daneben vermindert die funktionelle Redundanz vieler Proteine die Festlegung einer Trafficking-Route. Komponenten des COVERT („class C core vacuole/endosome tethering“) -Komplexes, welcher Membranfusionen im späten Endosom vermittelt, hatten keine essentielle Funktion beim K28-Toxintransport, wie in der vorliegenden Arbeit belegt wurde (Markgraf *et al.*, 2009). Der Transport von Membranproteinen aus dem frühen Endosom kann durch Nexine, welche an Lipide endosomaler Membranen binden, vermittelt werden (Hettema *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit in diesem Zusammenhang getesteten Deletionsmutanten zeigten alle bis auf $\Delta pep12$ wildtypische K28-Sensitivität. Pep12p ist als Syntaxin-Homolog an

dem intrazellulären Transport von Vesikeln im prävakuolären Kompartiment beteiligt und somit für den Transport von Plasmamembranrezeptoren wie Ste3p zur Vakuole verantwortlich (Becherer *et al.*, 1996; Gerrard *et al.*, 2000). Die Deletion dieses multifunktionalen t-SNARE führte zu einer K28-Hypersensitivität, da der vakuoläre Toxintransport unterbleibt und vermehrt K28-Moleküle in den retrograden Transportweg eingeschleust werden.

Die an der K28-Endozytose und dem intrazellulären Transport bis in das ER beteiligten Proteine sind in Abb. 77 zusammenfassend dargestellt. Dabei wurden sowohl Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als auch früherer Untersuchungen zusammengefasst und nur Proteine berücksichtigt, deren Mutation einen starken Phänotyp hervorrief (Eisfeld, 2001; Heiligenstein, 2008). Ähnliche Mechanismen wurden auch bei der Internalisierung von A/B-Toxinen in Säugerzellen beschrieben. Das Cholera-Toxin bindet beispielsweise ebenso wie K28 an Erd2p spezifisch und mit hoher Affinität an seinen Zelloberflächenrezeptor, das Gangliosid GM1 (Lencer *et al.*, 1999). Punktmutationen, welche in den Diphtherie-Toxin-Rezeptor eingebracht wurden, verhindern die Toxinaufnahme (Almond & Eidels, 1994). Der Toxinrezeptor ist ebenfalls entscheidend für das intrazelluläre Targeting des Toxins, was am Beispiel des Shiga-Toxin-Rezeptors belegt wurde (Sandvig & van Deurs, 1996; Arab & Lingwood, 1998).

Obwohl A/B-Toxine alle bekannten Mechanismen zum Zelleintritt nutzen, konnte die Internalisierung des Diphtherie-Toxins und des *Pseudomonas* Exotoxin A der Clathrin-abhängigen Endozytose zugeordnet werden (Moya *et al.*, 1985; Simpson *et al.*, 1998; Skretting *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1983; Kounnas *et al.*, 1992). Die Aufnahme des Shiga-Toxins wird durch Mutation von Eps15, einem Ubiquitin-bindenden Protein, teilweise inhibiert, was der reduzierten K28-Sensitivität einer *Δede1* Mutante (Hefehomolog zu Eps15) entspricht (Heiligenstein, 2008; Nichols *et al.*, 2001). Sowohl für das Shiga-Toxin als auch das Cholera-Toxin ist der Mechanismus der Rezeptorerkennung nicht bekannt (Sandvig & van Deurs, 2002). Die Erkennung des Anthrax-Rezeptors basiert auf dessen Ubiquitinierung, welche durch β -Arrestine vermittelt wird (Abrami *et al.*, 2006; 2010). Diese können als Adapteren für Clathrin oder E3 Ubiquitin-Ligasen fungieren (Mittal & McMahon, 2009; Lin *et al.*, 2008). Ihre Funktion ist somit mit denen der ART-Proteine in *S. cerevisiae* vergleichbar (Shenoy *et al.*, 2008, Conibear, 2010). Die Clathrin-abhängige Endozytose des Anthrax-Rezeptors wird durch den AP-1 Komplex ermöglicht, welcher im Gegensatz zum AP-2 Komplex in Säugerzellen ursprünglich nicht mit der Endozytose, sondern dem Vesikeltransport im *trans*-Golgi und den Endosomen in Verbindung gebracht wurde (Edeling *et al.*, 2006). Auch ein funktionsfähiges Aktinzytoskelett verbunden mit der Myosin-Motoraktivität sind zur Endozytose des Anthrax-Toxins essentiell (Abrami *et al.*, 2010). Die Situation ist folglich mit der K28-Aufnahme vergleichbar, die ebenfalls auf Ubiquitinierung, ungewöhnlichen Adapter-Komplexen, Clathrin sowie Aktin und Myosin basiert. Im weiteren Verlauf des intrazellulären Toxintransports wird ein Teil der internalisierten Ricin-Moleküle zu den Lysosomen transportiert und abgebaut, was

der teilweisen vakuolären Degradation von K28 entspricht (van Deurs *et al.*, 1995; van Deurs *et al.*, 1988). Ähnlich wie K28 nutzen auch humanpathogene A/B-Toxine mehrere Transportrouten, um in den Golgi zu gelangen. Shiga-Toxin, Cholera-Toxin und Ricin erreichen direkt von den frühen Endosomen aus den Golgi (Mallard *et al.*, 1998; Iversen *et al.*, 2001). *Pseudomonas* Exotoxin A besitzt wie K28 ein K/HDEL-ähnliches Retentionssignal, was eine Bindung an den H/KDEL-Rezeptor und damit den COP I-vermittelten retrograden Transport in das ER ermöglicht (Chaudhary *et al.*, 1990; Hessler & Kreitman, 1997; Jackson *et al.*, 1999). Dieser Vergleich bestätigt das Toxin K28 als ein geeignetes Modelltoxin, nicht nur zur Untersuchung der Internalisierung von medizinisch relevanten A/B-Toxinen, sondern auch zur Aufklärung der endozytotischen Prozesse und daran beteiligter Komponenten. Die Vielfalt der möglichen Rezeptorerkennungsmechanismen und Adaptoren bleibt nicht auf höhere Eukaryoten beschränkt, sondern findet sich auch in dem einzelligen Modellorganismus *S. cerevisiae*.

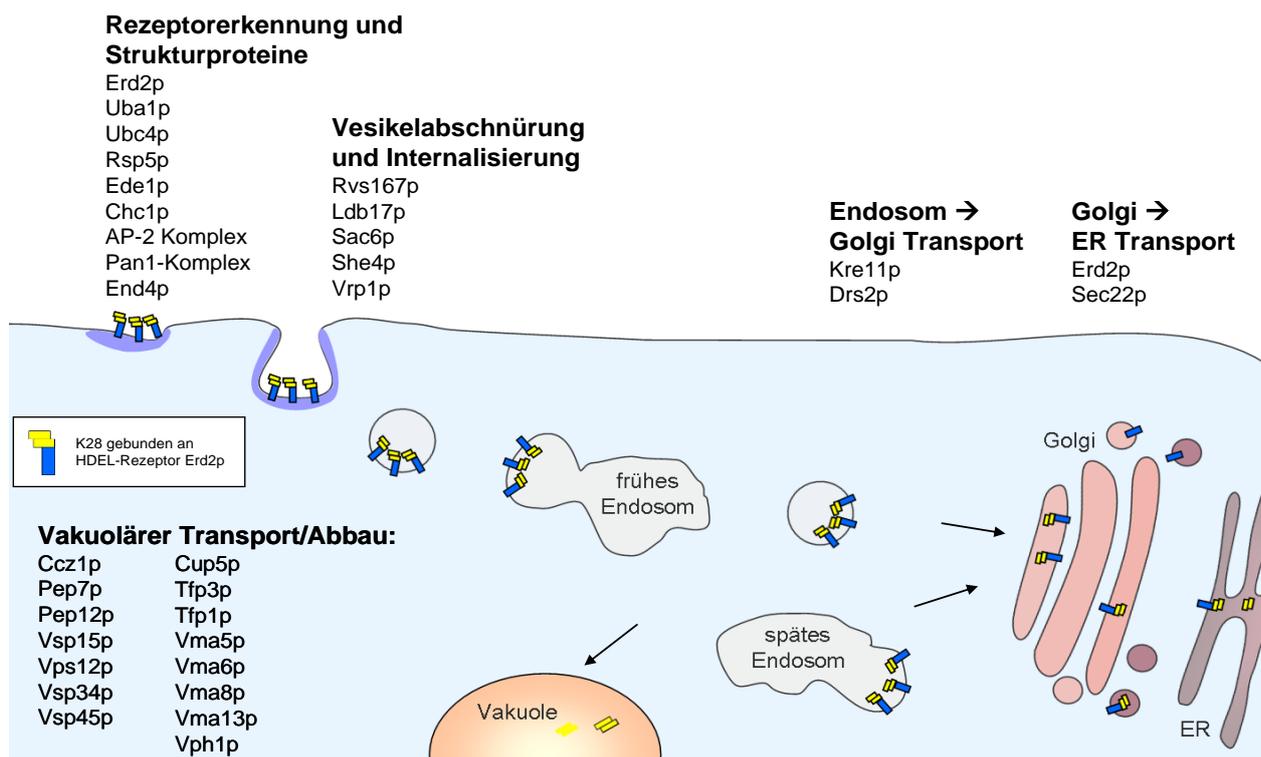


Abb. 77: Modell der K28-Internalisierung und des retrograden Transports. Aufgeführt sind Proteine, deren Beteiligung an der K28-Aufnahme und dem intrazellulären Toxintransport bis in das Endoplasmatische Retikulum oder dem vakuolären Abbau eindeutig nachgewiesen wurde bzw. deren Deletionsmutanten einen deutlich veränderten Phänotyp aufwiesen (diese Arbeit; Eisfeld, 2001; Heiligenstein, 2008).

Ausblick

Die Visualisierung der K28-Endozytose und des intrazellulären Transports eröffnet vielfältige Möglichkeiten, diese Prozesse sowie die daran beteiligten Proteine zu charakterisieren. Allerdings gelang durch die Fusion von K28 mit Fluoreszenzproteinen auf genetischer Ebene kein intrazellulärer Toxinnachweis. Nicht genetisch kodierte Fluorophore zeigen im Allgemeinen eine stärkere Helligkeit und eine höhere Photostabilität und könnten daher eventuell den fluoreszenzmikroskopischen intrazellulären K28-Nachweis ermöglichen. Diese Methoden basieren auf der kovalenten Bindung des Fluorophors an eine kurze genetisch kodierte Erkennungssequenz, wobei es sich um eine TetraCys- oder HexaHis-Abfolge handeln kann (Fernandez-Suarez & Ting, 2008). Allerdings muss K28 zur Kopplungsreaktion in möglichst reiner Form vorliegen, was bisher nicht erreicht werden konnte. Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von K28-V5 behandelten Hefezellen deuten außerdem darauf hin, dass die internalisierte Toxinmenge auch mit dieser Methode unter der Nachweisgrenze liegt (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Säugerzelllinien stellen allein aufgrund ihrer Größe, welche die einer Hefezelle um das Mehrfache übersteigt, ein alternatives Modellsystem zur Analyse der K28-Internalisierung dar. Somit sollte die internalisierte Toxinmenge entsprechend besser fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sein. Da die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem K28 durch HeLa-Zellen nicht bestätigt wurde, sollten weitere Zelllinien getestet werden. Da Klein (2009) internalisiertes wildtypisches K28 im Zellaufschluss detektieren konnte, könnte auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung Aufschluss über den intrazellulären Toxinweg geben. Der bisher fehlende Nachweis einer toxischen Wirkung von K28 könnte durch die Verwendung primärer Zellen erreicht werden, welche einen normalen Zellzyklus durchlaufen. Dabei sollte jedoch wiederum nur gereinigtes K28-Konzentrat zur Anwendung kommen, da ein möglicher K28-spezifischer Effekt sonst durch die Toxizität der Negativkontrolle überdeckt werden könnte (Kelkel, 2009; Klein, 2009).

Nach den Voruntersuchungen von Klein (2009), wonach K28 mit einem C-terminalen HDEL-Signal von Säugerzellen internalisiert wurde, könnte der Rezeptor Erd23 analog der Situation in *S. cerevisiae* als K28-Rezeptor fungieren. Dies setzt jedoch ebenfalls eine Kolo-kalisation des Rezeptors an der Plasmamembran voraus. Um diese zu bestätigen, sollten die Experimente zur Rezeptorlokalisierung mit photoaktivierbaren Rezeptorvarianten ausgeweitet werden. Dabei kann gezielt eine Teilmenge der Rezeptoren, vornehmlich an der Plasmamembran, visualisiert werden (Schuster *et al.*, 2011). Mit dieser Technik sollten auch ein Tracking der Rezeptorbewegung und eine Bestimmung der Rezeptormobilität unter verschiedenen Bedingungen, ähnlich zu den Untersuchungen in Hefezellen, möglich sein. Dazu zählt neben dem „knock-down“ von Komponenten der Endozytose und des intrazellulären Transports auch der Einsatz spezifischer Transportinhibitoren (Johannes & Popoff, 2008; Stechmann *et al.*, 2010).

Um eindeutig eine Kollokalisierung des Rezeptors an der Plasmamembran in Säugerzellen nachzuweisen, kann eine Markierung mit der α -Bungarotoxin-Bindesequenz in einem potentiell extrazellulären Bereich auf genetischer Ebene erfolgen. Fluoreszenzmarkiertes α -Bungarotoxin bindet mit hoher Affinität an dieses Tag und markiert so spezifisch Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Sekine-Aizawa & Haganir, 2004; Kumari *et al.*, 2008). Die Aufnahme eines natürlichen Liganden durch H/KDEL-Rezeptoren an der Plasmamembran könnte am Beispiel von fluoreszenzmarkiertem BiP, dem Kar2p-Homolog, das als GFP-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden kann, verfolgt werden (Lai *et al.*, 2010).

Um den Ablauf der endozytotischen Internalisierung von K28 im Komplex mit dem HDEL-Rezeptor und die beteiligten Komponenten in Hefezellen weiter aufzuklären, sollten zunächst die Rezeptorphosphorylierung und -ubiquitinierung, welche im Rahmen des „PURE-Pathway“ beschrieben sind, biochemisch bestätigt werden. Bisherige Erkenntnisse basieren lediglich auf indirekten Hinweisen. Die Phosphorylierung fungiert als positiver Regulator der Ubiquitinierung und wird durch eine Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht. Eine metabolische Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat oder ^{35}S -Met/Cys gefolgt von einer Immunopräzipitation des V5-markierten Rezeptors kann Aufschluss über eine eventuelle Phosphorylierung von Erd2p geben (Kelm *et al.*, 2004). Auch der direkte Nachweis der Ubiquitinierung steht noch aus, was auf die schwierigen experimentellen Bedingungen zurückzuführen ist (Dausend, 2010). Durch Immunopräzipitation von Erd2p-V5, exprimiert in einer Δend4 -Mutante, welche Endozytose-Defekte aufweist und den ubiquitinierten α -Faktor-Rezeptor akkumuliert, könnte der Nachweis einer Rezeptorubiquitinierung erreicht werden (Hicke & Riezman, 1996). Eine vorausgehende Inkubation mit dem Liganden K28 sollte sowohl den biochemischen Nachweis der Phosphorylierung als auch der Ubiquitinierung erleichtern. Alternativ kann auch der BiFC-Assay zur Bestätigung eine Interaktion zwischen Ubiquitin und dem HDEL-Rezeptor herangezogen werden. Schorr etablierte 2009 dieses System in *S. cerevisiae* zum Nachweis der Ubiquitinierung am Beispiel einer mutierten Form der Carboxypeptidase CPY*, die als ERAD-Substrat nach der Retrotranslokation ubiquitiniert wird. Um die Vermutung zu untermauern, dass eine Monoubiquitinierung zur Erd2p-Endozytose ausreicht, kann der K28-Phänotyp von Hefezellen bestimmt werden, denen alle vier Ubiquitin-kodierenden Gene fehlen und wildtypische Mengen an mutiertem Ubiquitin Plasmid-getrieben exprimieren (Spence *et al.*, 1995). Das Ubiquitinierungssignal wird möglicherweise durch Epsine und Ede1p erkannt. Ob dieser Mechanismus auch für die Erd2p-Internalisierung relevant ist, kann durch Bestimmung des K28-Phänotyps von Mehrfachdeletionsmutanten, denen die entsprechenden Ubiquitin-Binde-Domänen fehlen, untersucht werden (Toshima *et al.*, 2009; Dores *et al.*, 2010).

Neben der Ubiquitinierung scheint die Erd2p-Endozytose durch weitere Rezeptorerkennungsmechanismen möglich zu sein, darunter die Interaktion von Sla1p mit NPF_{X(1,2)D}-ähnlichen Motiven und der AP-2 Komplex. Durch Deletion des vollständigen NPF_{RILGD}-Signals im N-Terminus von Erd2p und Analyse der K28-Sensitivität kann ersteres bestätigt werden. Die bisherigen Daten deuten auf ein komplexes Zusammenspiel von Ubiquitinierung, NPF_{X(1,2)D}- und AP-2-vermittelter Rezeptorerkennung hin. Ein ähnliches Phänomen beschreiben Goh *et al.* für die Clathrin-abhängige Endozytose des EGF („epidermal growth factor“) -Rezeptors, die durch vier verschiedene Mechanismen reguliert wird, die sowohl redundant als auch kooperativ wirken können. Neben posttranslationalen Modifikationen wie der Ubiquitinierung und Acetylierung wurden auch zwei Adapter-Proteine identifiziert (Goh *et al.*, 2010). Daher ist von besonderem Interesse, wie sich die Deletion bzw. Mutation aller drei potentiellen Endozytose-Motive des HDEL-Rezeptors auf dessen Internalisierung auswirkt. Vorausgesetzt, diese Mutationen führen nicht zu einem Erd2p-Funktionsverlust, sind die Auswirkungen auf die K28-Endozytose zu analysieren. Diese Rezeptorvariante eignet sich ebenfalls, um die physiologische Funktion der Erd2p-Kolokalisierung an der Plasmamembran zu adressieren. Diese könnte in der Internalisierung sekretierter HDEL-tragender Proteine liegen. Bei einer starken Beeinträchtigung der Erd2p-Endozytose, die bei der oben beschriebenen Mutation zu erwarten ist, sollte die Menge an HDEL-Proteinen im Zellüberstand entsprechend zunehmen. Eventuelle Auswirkungen auf die Zellvitalität können durch Wachstumstests detektiert werden. Diese Ansatzpunkte könnten dazu beitragen, die Endozytose und den intrazellulären Transport des K28/Erd2p Liganden/Rezeptor-Komplexes aufzuklären sowie die mögliche physiologische Funktion der Erd2p-Kolokalisation an der Plasmamembran zu bestimmen.

5. Zusammenfassung

Das viral kodierte Toxin K28 wird nach Prozessierung des Präprotoxin-Vorläufers als α/β -Heterodimer von Killerstämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sezerniert und tötet sensitive Zellen durch Arretierung des Zellzyklus, Inhibierung der DNA-Synthese und Induktion der Apoptose. Die Intoxikation der Zielzelle beginnt mit der Bindung des A/B-Toxins an dessen Primärrezeptor, ein Zellwandmannoprotein, gefolgt von einer Interaktion mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran, welche durch das K28-eigene C-terminale HDEL-Motiv ermöglicht wird. Der Rezeptor vermittelt nach endozytotischer Internalisierung im Komplex mit K28 den retrograden Toxintransport entlang des Sekretionswegs. Nach Dissoziation des Rezeptor/Liganden-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum erreicht das Heterodimer das Zytosol, so dass die α -Untereinheit ihre toxische Aktivität im Nukleus entfalten kann, während K28 β nach Ubiquitinierung proteosomal degradiert wird. Als Mitglied der A/B-Toxin Familie stimmt nicht nur der K28-Aufbau, sondern auch die Wirkungsweise in vielen Punkten mit medizinisch relevanten humanpathogenen Vertretern wie Shiga-Toxin, Cholera-Toxin oder Ricin überein. Darüberhinaus eignet sich das Toxin als Modell-Cargo zur Aufklärung der Endozytose in der Hefe *S. cerevisiae*, einem essentiellen mehrstufigen Prozess, der zur Aufrechterhaltung der Plasmamembranzusammensetzung und Aufnahme von Makromolekülen notwendig ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Visualisierung der K28-Internalisierung, die Plasmamembranlokalisation des Toxinrezeptors sowie der Ablauf der endozytotischen K28-Internalisierung und die daran beteiligten Komponenten adressiert. Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der K28-Aufnahme und des intrazellulären Toxintransports wurden fluoreszenzmarkierte K28-Varianten hergestellt. Die Fusionen aus K28 und Fluoreszenzproteinen wie mCherry oder GFP wurden von *Pichia pastoris* und *Kluyveromyces lactis* als korrekt prozessierte Toxinchimären sekretiert. Erst durch Kultivierung von *P. pastoris* im Fermenter unter ständiger Kontrolle der Wachstums- und Induktionsparameter gelang die Produktion von fluoreszierenden K28-Varianten, deren Toxizität gegenüber sensitiven Hefezellen erhalten blieb.

Die Inkubation sensitiver Hefezellen mit biologisch aktiven K28-mCherry^{HDEL}-Toxininfusionen führte zu einer starken Fluoreszenz der Zellperipherie, welche eindeutig auf eine durch die β -Untereinheit vermittelte Bindung des Toxins an den K28-Primärrezeptor auf Zellwandebene zurückzuführen war. Weder durch den Einsatz hochauflösender Mikroskopie-Techniken noch durch Entfernen der starken Zellwandfluoreszenz wurden intrazelluläre Fluoreszenzsignale detektiert. Dass auch durch Variation der Inkubationsbedingungen oder den Einsatz hypersensitiver Hefestämme keine K28-Fluoreszenz im Zellinneren erhalten wurde, lässt auf eine sehr geringe Menge an internalisierten Toxinmolekülen schließen, die zur Ausbildung der toxischen Wirkung ausreicht. Auch Säugerzellen akkumulierten die fluoreszierenden K28-Varianten im Zellrandbereich, ohne dass eine Toxinaufnahme nachgewiesen werden konnte.

Die Kolokalisation an der Plasmamembran und endozytotische Internalisierung des vornehmlich in ER und Golgi lokalisierten HDEL-Rezeptors wurde bestätigt: Fluoreszenzmikroskopisch wurde Erd2-GFP mit einem Endozytose-Marker, dem Farbstoff FM4-64, sowohl an der Plasmamembran als auch in endosomalen Kompartimenten kolokalisiert. Die Deletion der Endozytosekomponente *END3* führte zu einer signifikanten Einschränkung der Rezeptormobilität. Obwohl der Nachweis des HDEL-Rezeptors an der Zelloberfläche mit Hilfe des „SNAP-Tag Surface“-Systems nicht gelang, konnte dessen Anwendung in Hefe etabliert werden. Die Aufnahme eines natürlichen Erd2p-Liganden (Kar2p) deutet auf eine physiologische Funktion der Lokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran hin.

Die Endozytose des Erd2p/K28-Rezeptor/Liganden-Komplexes wird durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Mechanismen reguliert. Der Ubiquitinierung scheint dabei keine essentielle Bedeutung zuzukommen, da die K28-Sensitivität nach Mutation der potentiellen Ubiquitinierungsstellen nicht signifikant verändert war. Vielmehr scheint eine gewisse Redundanz verschiedener Prozesse vorzuliegen, denn auch die Erkennung des NPF_{X(1,2)}D-ähnlichen Motives im Erd2p-N-Terminus durch die SHD1-Domäne des Adapterproteins Sla1p ist für die Erd2p-Endozytose relevant. Die Beteiligung des AP-2 Komplexes an der Endozytose in Hefezellen wurde erstmals nachgewiesen, da entsprechende Deletionsmutanten das Toxin nicht internalisierten und einen K28-resistenten Phänotyp aufwiesen.

6. Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and P. Borst (1972):** The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**, 192-200.
- Abrami, L., M. Bischofberger, B. Kunz, R. Groux and F. G. van der Goot (2010):** Endocytosis of the Anthrax-Toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog* **6**, e1000792.
- Abrami, L., S. H. Leppla and F. G. van der Goot (2006):** Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate Anthrax-Toxin endocytosis. *J Cell Biol* **172**, 309-20.
- Adams, A. E., D. Botstein and D. G. Drubin (1991):** Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis *in vivo*. *Nature* **354**, 404-8.
- Aghamohammadzadeh, S. and K. R. Ayscough (2009):** Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol* **11**, 1039-42.
- Aguilar, R. C., H. A. Watson and B. Wendland (2003):** The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *J Biol Chem* **278**, 10737-43.
- Ai, H. W., J. N. Henderson, S. J. Remington and R. E. Campbell (2006):** Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem J* **400**, 531-40.
- Ai, H. W., S. G. Olenych, P. Wong, M. W. Davidson and R. E. Campbell (2008):** Hue-shifted monomeric variants of *Clavularia* cyan fluorescent protein: identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging. *BMC Biol* **6**, 13.
- Alami, M., M. P. Taupiac, H. Reggio, A. Bienvenue and B. Beaumelle (1998):** Involvement of ATP-dependent *Pseudomonas* exotoxin translocation from a late recycling compartment in lymphocyte intoxication procedure. *Mol Biol Cell* **9**, 387-402.
- Almond, B. D. and L. Eidels (1994):** The cytoplasmic domain of the diphtheria toxin receptor (HB-EGF precursor) is not required for receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* **269**, 26635-41.
- Altmeyer, A., R. G. Maki, A. M. Feldweg, M. Heike, V. P. Protopopov, S. K. Masur and P. K. Srivastava (1996):** Tumor-specific cell surface expression of the KDEL-containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer* **69**, 340-9.
- Anand, V. C., L. Daboussi, T. C. Lorenz and G. S. Payne (2009):** Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 1592-604.
- Anderson, K. I., J. Sanderson, S. Gerwig and J. Peychl (2006):** A new configuration of the Zeiss LSM 510 for simultaneous optical separation of green and red fluorescent protein pairs. *Cytometry A* **69**, 920-9.
- Anderson, R. G. and R. K. Pathak (1985):** Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell* **40**, 635-43.
- Aoe, T., I. Huber, C. Vasudevan, S. C. Watkins, G. Romero, D. Cassel and V. W. Hsu (1999):** The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain. *J Biol Chem* **274**, 20545-9.
- Arab, S. and C. A. Lingwood (1998):** Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *J Cell Physiol* **177**, 646-60.
- Ayscough, K. R., J. J. Eby, T. Lila, H. Dewar, K. G. Kozminski and D. G. Drubin (1999):** Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol Biol Cell* **10**, 1061-75.
- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa and S. D. Emr (1998):** The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J* **17**, 2982-93.
- Babu, P., J. D. Bryan, H. R. Panek, S. L. Jordan, B. M. Forbrich, S. C. Kelley, R. T. Colvin and L. C. Robinson (2002):** Plasma membrane localization of the Yck2p yeast casein kinase 1 isoform requires the C-terminal extension and secretory pathway function. *J Cell Sci* **115**, 4957-68.
- Baggett, J. J., J. D. Shaw, C. J. Sciambi, H. A. Watson and B. Wendland (2003):** Fluorescent labeling of yeast. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 4, Unit 4 13.
- Bahir, I. and M. Linial (2005):** ProTeus: identifying signatures in protein termini. *Nucleic Acids Res* **33**, W277-80.
- Bajaj, A., A. Celic, F. X. Ding, F. Naider, J. M. Becker and M. E. Dumont (2004):** A fluorescent alpha-factor analogue exhibits multiple steps on binding to its G protein coupled receptor in yeast. *Biochemistry* **43**, 13564-78.
- Bandlow, W., S. Wied and G. Muller (1995):** Glucose induces amphiphilic to hydrophilic conversion of a subset of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoproteins in yeast. *Arch Biochem Biophys* **324**, 300-16.
- Banting, G. and S. Ponnambalam (1997):** TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta* **1355**, 209-17.
- Barfield, R. M., J. C. Fromme and R. Schekman (2009):** The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 4985-96.
- Baumann, K., M. Carnicer, M. Dragosits, A. B. Graf, J. Stadlmann, P. Jouhten, H. Maaheimo, B. Gasser, et al. (2010):** A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol* **4**, 141.
- Baumann, K., M. Maurer, M. Dragosits, O. Cos, P. Ferrer and D. Mattanovich (2008):** Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* **100**, 177-83.
- Becherer, K. A., S. E. Rieder, S. D. Emr and E. W. Jones (1996):** Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol Biol Cell* **7**, 579-94.

- Beck, T., A. Schmidt and M. N. Hall (1999): Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol* **146**, 1227-38.
- Becker, B. and M. J. Schmitt (2011): Adapting Yeast as Model to Study Ricin Toxin A Uptake and Trafficking. *Toxins* **3**, 834-847.
- Beraud-Dufour, S. and W. Balch (2002): A journey through the exocytic pathway. *J Cell Sci* **115**, 1779-80.
- Bergquist, P. L., V. S. Te'o, M. D. Gibbs, A. C. Cziferszky, F. P. De Faria, M. O. Azevedo and K. M. Nevalainen (2002): Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Appl Biochem Biotechnol* **98-100**, 165-76.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998): Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-8.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-29.
- Bevan, E. A. and M. Makower (1963): The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc Xlth Int Congr Genet* **1**, 202-203.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blackwell, J. R. and R. Horgan (1991): A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* **295**, 10-2.
- Bleackley, M. R. and R. T. Macgillivray (2011): Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*.
- Blondeau, K., O. Boutur, H. Boze, G. Jung, G. Moulin and P. Galzy (1994): Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 beta production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the PHO5 promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 324-9.
- Boehm, T., S. Pirie-Shepherd, L. B. Trinh, J. Shiloach and J. Folkman (1999): Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin. *Yeast* **15**, 563-72.
- Boettner, D. R., J. L. D'Agostino, O. T. Torres, K. Daugherty-Clarke, A. Uygur, A. Reider, B. Wendland, S. K. Lemmon, et al. (2009): The F-BAR protein Syp1 negatively regulates WASp-Arp2/3 complex activity during endocytic patch formation. *Curr Biol* **19**, 1979-87.
- Bollok, M., D. Resina, F. Valero and P. Ferrer (2009): Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. *Recent Pat Biotechnol* **3**, 192-201.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003): Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Boone, C., A. M. Sdicu, J. Wagner, R. Degre, C. Sanchez and H. Bussey (1990): Integration of the yeast KI killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on venification. *American J Enol Vitic* **41**, 37-42.
- Borzani, W. and M. L. Vairo (1958): Quantitative adsorption of methylene blue by dead yeast cells. *J Bacteriol* **76**, 251-5.
- Bostian, K. A., J. E. Hopper, D. T. Rogers and D. J. Tipper (1980): Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell* **19**, 403-14.
- Botstein, D., S. A. Chervitz and J. M. Cherry (1997): Yeast as a model organism. *Science* **277**, 1259-60.
- Brach, T., T. Specht and M. Kaksonen (2011): Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J Cell Sci* **124**, 328-37.
- Bracke, J. (1990): Alpha-factor leader directed secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol* **185**, 408-421.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela, et al. (1984): Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4642-6.
- Braun, R. J., S. Buttner, J. Ring, G. Kroemer and F. Madeo (2010): Nervous yeast: modeling neurotoxic cell death. *Trends Biochem Sci* **35**, 135-44.
- Breinig, F., T. Sendzik, K. Eisfeld and M. J. Schmitt (2006): Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3810-5.
- Breinig, F., D. J. Tipper and M. J. Schmitt (2002): Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* **108**, 395-405.
- Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Kneuhl, M. C. Towler and D. E. Wakeham (2001): Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 517-68.
- Brodsky, J. L., E. D. Werner, M. E. Dubas, J. L. Goeckeler, K. B. Kruse and A. A. McCracken (1999): The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* **274**, 3453-60.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47.
- Bryant, N. J. and A. Boyd (1993): Immunolocalisation of Kex2p-containing organelles from yeast demonstrates colocalisation of three processing proteinases to a single Golgi compartment. *J Cell Sci* **106**, 815-22.
- Bukusoglu, G. and D. D. Jenness (1996): Agonist-specific conformational changes in the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol Cell Biol* **16**, 4818-23.
- Burston, H. E., L. Maldonado-Baez, M. Davey, B. Montpetit, C. Schluter, B. Wendland and E. Conibear (2009): Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *J Cell Biol* **185**, 1097-110.
- Bussey, H., D. Saville, K. Hutchins and R. G. Palfrey (1979): Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **140**, 888-92.
- Butler, A. R., R. W. O'Donnell, V. J. Martin, G. W. Gooday and M. J. Stark (1991): *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem* **199**, 483-8.

- Butler, A. R., J. H. White and M. J. R. Stark (1991):** Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J Gen Microbiol* 137, 1749-1757.
- Cabrera, M., M. Muniz, J. Hidalgo, L. Vega, M. E. Martin and A. Velasco (2003):** The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol Biol Cell* 14, 4114-25.
- Cai, D., K. J. Verhey and E. Meyhofer (2007):** Tracking single Kinesin molecules in the cytoplasm of mammalian cells. *Biophys J* 92, 4137-44.
- Cailliez, J. C., M. Gerloni, G. Morace, S. Conti, C. Cantelli and L. Polonelli (1992):** Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. *Biol Cell* 75, 19-23.
- Calvin, N. M. and P. C. Hanawalt (1988):** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, 2796-801.
- Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2002):** A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7877-82.
- Campbell, T. N. and F. Y. Choy (2002):** Expression of two green fluorescent protein variants in citrate-buffered media in *Pichia pastoris*. *Anal Biochem* 311, 193-5.
- Capitani, M. and M. Sallèse (2009):** The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett* 583, 3863-71.
- Cappel, S. (2006):** Untersuchungen zur Rezeptor-vermittelten Endozytose und zum retrograden Toxintransport am Beispiel eines viralen A/B-Toxins der Hefe. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Carroll, S. Y., P. C. Stirling, H. E. Stimpson, E. Giesselmann, M. J. Schmitt and D. G. Drubin (2009):** A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev Cell* 17, 552-60.
- Carvalho, P., A. M. Stanley and T. A. Rapoport (2010):** Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* 143, 579-91.
- Caston, J. R., B. L. Trus, F. P. Booy, R. B. Wickner, J. S. Wall and A. C. Steven (1997):** Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol* 138, 975-85.
- Celik, E., P. Calik and S. G. Oliver (2009):** Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast* 26, 473-84.
- Cereghino, G. P., J. L. Cereghino, C. Ilgen and J. M. Cregg (2002):** Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13, 329-32.
- Cereghino, G. P. and J. M. Cregg (1999):** Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 10, 422-7.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000):** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 45-66.
- Cha, H. J., N. N. Dalal and W. E. Bentley (2005):** Secretion of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in recombinant *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 126, 1-11.
- Chakraborty, S. K., J. A. Fitzpatrick, J. A. Phillippi, S. Andreko, A. S. Waggoner, M. P. Bruchez and B. Ballou (2007):** Cholera-Toxin B conjugated quantum dots for live cell labeling. *Nano Lett* 7, 2618-26.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994):** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-5.
- Chamberlain, C. and K. M. Hahn (2000):** Watching proteins in the wild: fluorescence methods to study protein dynamics in living cells. *Traffic* 1, 755-62.
- Chardin, P. and F. McCormick (1999):** Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97, 153-5.
- Chattaway, M. A., T. Dallman, I. N. Okeke and J. Wain (2011):** Enteroaggregative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again? *J Infect Dev Ctries* 5, 425-36.
- Chaudhary, V. K., Y. Jinno, D. FitzGerald and I. Pastan (1990):** *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 308-12.
- Chazaud, B., M. P. Muriel, M. Aubery and M. Decastel (1995):** Ricin toxicity and intracellular routing in tumoral HT-29 cells. I. Ricin routing and toxicity are related to the state of differentiation of HT-29 cells. *Exp Cell Res* 221, 205-13.
- Chen, C. and X. Zhuang (2008):** Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11790-5.
- Chen, X., B. Gao, W. Shi and Y. Li (1992):** Expression and secretion of human interferon alpha A in yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yi Chuan Xue Bao* 19, 284-8.
- Chen, Z. J. and L. J. Sun (2009):** Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* 33, 275-86.
- Cheng, R. H., J. R. Caston, G. J. Wang, F. Gu, T. J. Smith, T. S. Baker, R. F. Bozarth, B. L. Trus, et al. (1994):** Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. *J Mol Biol* 244, 255-8.
- Chithrani, B. D. and W. C. Chan (2007):** Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett* 7, 1542-50.
- Chu, D. S., B. Pishvaei and G. S. Payne (1996):** The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 33123-30.
- Chuang, E., M. L. Alegre, C. S. Duckett, P. J. Noel, M. G. Vander Heiden and C. B. Thompson (1997):** Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *J Immunol* 159, 144-51.
- Cid, V. J., A. Duran, F. del Rey, M. P. Snyder, C. Nombela and M. Sanchez (1995):** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 59, 345-86.
- Clancy, B. and L. J. Caulier (1998):** Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J Neurosci Methods* 83, 97-102.

- Clare, J. J., M. A. Romanos, F. B. Rayment, J. E. Rowedder, M. A. Smith, M. M. Payne, K. Sreeriksha and C. A. Henwood (1991): Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105, 205-12.
- Cohen, R. E., L. Ballou and C. E. Ballou (1980): *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase mutants. Isolation of the *mnn5* mutant and comparison with the *mnn3* strain. *J Biol Chem* 255, 7700-7.
- Cohen, R. E., W. Zhang and C. E. Ballou (1982): Effects of mannosyltransferase mutations on *Saccharomyces cerevisiae* core oligosaccharide structure. *J Biol Chem* 257, 5730-7.
- Collawn, J. F., M. Stangel, L. A. Kuhn, V. Esekogwu, S. Q. Jing, I. S. Trowbridge and J. A. Tainer (1990): Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* 63, 1061-72.
- Collier, R. J. (2001): Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 39, 1793-803.
- Collins, B. M., A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans and D. J. Owen (2002): Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109, 523-35.
- Colussi, P. A. and C. H. Taron (2005): *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71, 7092-8.
- Colwill, K., D. Field, L. Moore, J. Friesen and B. Andrews (1999): *In vivo* analysis of the domains of yeast Rvs167p suggests Rvs167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics* 152, 881-93.
- Comitini, F., N. Di Pietro, L. Zacchi, I. Mannazzu and M. Ciani (2004): *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology* 150, 2535-41.
- Conibear, E. Converging views of endocytosis in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 22, 513-8.
- Cope, M. J., S. Yang, C. Shang and D. G. Drubin (1999): Novel protein kinases Ark1p and Prk1p associate with and regulate the cortical actin cytoskeleton in budding yeast. *J Cell Biol* 144, 1203-18.
- Cormack, B. P., G. Bertram, M. Egerton, N. A. Gow, S. Falkow and A. J. Brown (1997): Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 303-11.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia and S. Falkow (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-8.
- Corsi, A. K. and R. Schekman (1997): The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 137, 1483-93.
- Cosson, P. and F. Letourneur (1994): Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629-31.
- Cregg, J. M., K. J. Barringer, A. Y. Hessler and K. R. Madden (1985): *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol* 5, 3376-85.
- Cregg, J. M. and K. R. Madden (1989): Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet* 219, 320-3.
- Cregg, J. M. and K. A. Russell (1998): Transformation. *Methods Mol Biol* 103, 27-39.
- Cui, J. and J. A. Kaandorp (2006): Mathematical modeling of calcium homeostasis in yeast cells. *Cell Calcium* 39, 337-48.
- Cui, J., J. A. Kaandorp, P. M. Sloot, C. M. Lloyd and M. V. Filatov (2009): Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* 9, 1137-47.
- Cusick, K. D., G. L. Boyer, S. W. Wilhelm and G. S. Saylor (2009): Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to saxitoxin. *Environ Sci Technol* 43, 6039-45.
- Daly, R. and M. T. Hearn (2005): Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18, 119-38.
- Darken, M. A. (1962): Absorption and transport of fluorescent brighteners by microorganisms. *Appl Microbiol* 10, 387-93.
- Dausend, J. (2010): *In vivo* Topologie und Lokalisation des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p und dessen Funktion bei der Endozytose des viralen K28-Toxins in Hefe. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Davidson, M. W. and R. E. Campbell (2009): Engineered fluorescent proteins: innovations and applications. *Nat Methods* 6, 713-17.
- De Nobel, J. G. and J. A. Barnett (1991): Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* 7, 313-23.
- Denecke, J., R. De Rycke and J. Botterman (1992): Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *Embo J* 11, 2345-55.
- Deng, C., X. Xiong and A. N. Krutchinsky (2009): Unifying fluorescence microscopy and mass spectrometry for studying protein complexes in cells. *Mol Cell Proteomics* 8, 1413-23.
- Denne, M. (2003): Versuche zur *in vivo* Lokalisation des HDEL-Rezeptors Erd2p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Dennis, P. A. and D. B. Rifkin (1991): Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 580-4.
- Denzer, K., B. Weber, A. Hille-Rehfeld, K. V. Figura and R. Pohlmann (1997): Identification of three internalization sequences in the cytoplasmic tail of the 46 kDa mannose 6-phosphate receptor. *Biochem J* 326, 497-505.
- Di Pietro, S. M., D. Cascio, D. Feliciano, J. U. Bowie and G. S. Payne (2010): Regulation of clathrin adaptor function in endocytosis: novel role for the SAM domain. *Embo J* 29, 1033-44.
- Di, R., E. Kyu, V. Shete, H. Saidasan, P. C. Kahn and N. E. Tumer (2011): Identification of amino acids critical for the cytotoxicity of Shiga-Toxin 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicon* 57, 525-39.

- Diehl, B. (2008):** MMPACE – ein hefezellbasierter Bioassay zur Hochdurchsatz-Testung spezifischer Inhibitoren gegen humane Matrix-Metalloproteasen. *Dissertation, Universität des Saarlandes.*
- Dmochowska, A., D. Dignard, D. Henning, D. Y. Thomas and H. Bussey (1987):** Yeast *KEX1* gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell* **50**, 573-84.
- Doherty, G. P., K. Bailey and P. J. Lewis (2010):** Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation in *Bacillus Subtilis*. *BMC Res Notes* **3**, 303.
- Dohmen, R. J., A. W. Strasser, C. B. Honer and C. P. Hollenberg (1991):** An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-2.
- Dominguez, A., E. Ferminan, M. Sanchez, F. J. Gonzalez, F. M. Perez-Campo, S. Garcia, A. B. Herrero, A. San Vicente, et al. (1998):** Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Int Microbiol* **1**, 131-42.
- Dores, M. R., J. D. Schnell, L. Maldonado-Baez, B. Wendland and L. Hicke** The function of yeast epsin and Ede1 ubiquitin-binding domains during receptor internalization. *Traffic* **11**, 151-60.
- Douglas, C. M., S. L. Sturley and K. A. Bostian (1988):** Role of protein processing, intracellular trafficking and endocytosis in production of and immunity to yeast killer toxin. *Eur J Epidemiol* **4**, 400-8.
- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988):** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.
- Dragosits, M., J. Stadlmann, J. Albiol, K. Baumann, M. Maurer, B. Gasser, M. Sauer, F. Altmann, et al. (2009):** The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J Proteome Res* **8**, 1380-92.
- Drubin, D. G., K. G. Miller and D. Botstein (1988):** Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol* **107**, 2551-61.
- Duncan, M. C., M. J. Cope, B. L. Goode, B. Wendland and D. G. Drubin (2001):** Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**, 687-90.
- Durr, G., J. Strayle, R. Plemper, S. Elbs, S. K. Klee, P. Catty, D. H. Wolf and H. K. Rudolph (1998):** The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* **9**, 1149-62.
- Dyballa, N. and S. Metzger (2009):** Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*.
- Edeling, M. A., C. Smith and D. Owen (2006):** Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 32-44.
- Ehrlich, M., W. Boll, A. Van Oijen, R. Hariharan, K. Chandran, M. L. Nibert and T. Kirchhausen (2004):** Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605.
- Eiden-Plach, A., T. Zagorc, T. Heintel, Y. Carius, F. Breinig and M. J. Schmitt (2004):** Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 961-6.
- Eiklid, K., S. Olsnes and A. Pihl (1980):** Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res* **126**, 321-6.
- Eisfeld, K. (2001):** Endozytose und retrograder Proteintransport am Beispiel des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation, Universität des Saarlandes.*
- Eisfeld, K., F. Riffer, J. Mentges and M. J. Schmitt (2000):** Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* **37**, 926-40.
- el Baya, A., R. Linnemann, L. von Olleschik-Elbheim, H. Robenek and M. A. Schmidt (1997):** Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur J Cell Biol* **73**, 40-8.
- El Hage, T., C. Merlen, S. Fabrega and F. Authier (2007):** Role of receptor-mediated endocytosis, endosomal acidification and cathepsin D in Cholera-Toxin cytotoxicity. *Febs J* **274**, 2614-29.
- Elmendorf, H. G. and K. Haldar (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. and K. Tsurugi (1988):** The RNA *N*-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem* **263**, 8735-9.
- Engedal, N., T. Skotland, M. L. Torgersen and K. Sandvig (2011):** Shiga-Toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microb Biotechnol* **4**, 32-46.
- Engqvist-Goldstein, A. E. and D. G. Drubin (2003):** Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
- Esteban, R. and R. B. Wickner (1986):** Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: *in vitro* M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol Cell Biol* **6**, 1552-61.
- Failer, B. U. (2002):** Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Nukleotid-hydrolysierenden Enzymen des Endomembransystems und der Zelloberfläche. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.*
- Falguieres, T. and L. Johannes (2006):** Shiga-Toxin B-subunit binds to the chaperone BiP and the nucleolar protein B23. *Biol Cell* **98**, 125-34.
- Falnes, P. O. and K. Sandvig (2000):** Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 407-13.
- Fan, J. Y., Z. Q. Cui, H. P. Wei, Z. P. Zhang, Y. F. Zhou, Y. P. Wang and X. E. Zhang (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.
- Fazekas de St Groth, S., R. G. Webster and A. Datyner (1963):** Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **71**, 377-91.

- Feng, Y. and N. G. Davis (2000): Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 5350-9.
- Fernandez-Suarez, M. and A. Y. Ting (2008): Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 929-43.
- Fleer, R., X. J. Chen, N. Amellal, P. Yeh, A. Fournier, F. Guinet, N. Gault, D. Faucher, et al. (1991): High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 beta in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **107**, 285-95.
- Foot, N. J., H. E. Dalton, L. M. Shearwin-Whyatt, L. Dorstyn, S. S. Tan, B. Yang and S. Kumar (2008): Regulation of the divalent metal ion transporter DMT1 and iron homeostasis by a ubiquitin-dependent mechanism involving Ndfips and WWP2. *Blood* **112**, 4268-75.
- Ford, M. G., I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans and H. T. McMahon (2002): Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361-6.
- Forster, M. L., K. Sivick, Y. N. Park, P. Arvan, W. I. Lencer and B. Tsai (2006): Protein disulfide isomerase-like proteins play opposing roles during retrotranslocation. *J Cell Biol* **173**, 853-9.
- Foury, F., A. Amory and A. Goffeau (1981): Large-scale purification and phosphorylation of a detergent-treated adenosine triphosphatase complex from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **119**, 395-400.
- Franz, S., K. Herrmann, B. G. Furnrohr, A. Sheriff, B. Frey, U. S. Gaipf, R. E. Voll, J. R. Kalden, et al. (2007): After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ* **14**, 733-42.
- Frenoy, J. P., E. Turpin, M. Janicot, F. Gehin-Fouque and B. Desbuquois (1992): Uptake of injected ¹²⁵I-ricin by rat liver *in vivo*. Subcellular distribution and characterization of the internalized ligand. *Biochem J* **284**, 249-57.
- Frohlich, F., K. Moreira, P. S. Aguilar, N. C. Hubner, M. Mann, P. Walter and T. C. Walther (2009): A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J Cell Biol* **185**, 1227-42.
- Fuller, R. S., A. J. Brake and J. Thorner (1989): Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**, 482-6.
- Gaber, R. F., D. M. Copple, B. K. Kennedy, M. Vidal and M. Bard (1989): The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol Cell Biol* **9**, 3447-56.
- Gagny, B., A. Wiedeker, P. Dumoulin, B. Winsor, H. Riezman and R. Haguenaer-Tsapis (2000): A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci* **113**, 3309-19.
- Galan, J. M., V. Moreau, B. Andre, C. Volland and R. Haguenaer-Tsapis (1996): Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* **271**, 10946-52.
- Gande, S. L., M. Mariappan, B. Schmidt, T. H. Pringle, K. von Figura and T. Dierks (2008): Paralog of the formylglycine-generating enzyme--retention in the endoplasmic reticulum by canonical and noncanonical signals. *Febs J* **275**, 1118-30.
- Garini, Y., B. J. Vermolen and I. T. Young (2005): From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 3-12.
- Geli, M. I. and H. Riezman (1996): Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* **272**, 533-5.
- Gerrard, S. R., B. P. Levi and T. H. Stevens (2000): Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment. *Traffic* **1**, 259-69.
- Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1983): Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* **131**, 1-15.
- Gheorghe, D. M., S. Aghamohammadzadeh, R. Smaczynska-de, II, E. G. Allwood, S. J. Winder and K. R. Ayscough (2008): Interactions between the yeast SM22 homologue Scp1 and actin demonstrate the importance of actin bundling in endocytosis. *J Biol Chem* **283**, 15037-46.
- Ghosh, P., N. M. Dahms and S. Kornfeld (2003): Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 202-12.
- Giepmans, B. N., S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien (2006): The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-24.
- Gießelmann, E. (2007): Analyse der *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Girod, A., B. Storrie, J. C. Simpson, L. Johannes, B. Goud, L. M. Roberts, J. M. Lord, T. Nilsson, et al. (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., V. Horejsi, U. H. Weidle, B. R. Binder, C. Hansmann and H. Stockinger (1999): M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. *Eur J Immunol* **29**, 1004-13.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, et al. (1996): Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-7.
- Goh, L. K., F. Huang, W. Kim, S. Gygi and A. Sorkin (2010): Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **189**, 871-83.
- Gonzalez-Gaitan, M. and H. Jackle (1997): Role of Drosophila alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell* **88**, 767-76.

- Goodman, A., B. L. Goode, P. Matsudaira and G. R. Fink (2003):** The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **14**, 2617-29.
- Gordon, V. M. and S. H. Leppla (1994):** Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infect Immun* **62**, 333-40.
- Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom and D. Hanahan (1990):** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-9.
- Griffith, J., M. Mari, A. De Maziere and F. Reggiori (2008):** A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **9**, 1060-72.
- Griffiths, G., M. Ericsson, J. Krijnse-Locker, T. Nilsson, B. Goud, H. D. Soling, B. L. Tang, S. H. Wong, et al. (1994):** Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol* **127**, 1557-74.
- Gross, L. A., G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige and R. Y. Tsien (2000):** The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11990-5.
- Grossmann, G., J. Malinsky, W. Stahlschmidt, M. Loibl, I. Weig-Meckl, W. B. Frommer, M. Opekarova and W. Tanner (2008):** Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* **183**, 1075-88.
- Grossmann, G., M. Opekarova, J. Malinsky, I. Weig-Meckl and W. Tanner (2007):** Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *Embo J* **26**, 1-8.
- Grossmann, G., M. Opekarova, L. Novakova, J. Stolz and W. Tanner (2006):** Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**, 945-53.
- Guida, L. (2007):** Sekretion und affinitätschromatographische Reinigung von FLAG- und FLAG/His-markierten Toxinvarianten von K28 in den Hefen *Kluyveromyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe*. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Gunge, N., A. Tamaru, F. Ozawa and K. Sakaguchi (1981):** Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol* **145**, 382-90.
- Gustafsson, M. G. (2000):** Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* **198**, 82-7.
- Guyard, C., N. Seguy, J. C. Cailliez, H. Drobecq, L. Polonelli, E. Dei-Cas, A. Mercenier and F. D. Menozzi (2002):** Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* **49**, 961-71.
- Hagel, L., H. Lundstrom, T. Andersson and H. Lindblom (1989):** Properties, in theory and practice, of novel gel filtration media for standard liquid chromatography. *J Chromatogr* **476**, 329-44.
- Halachmi, D. and Y. Eilam (1989):** Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett* **256**, 55-61.
- Hamada, H., M. Suzuki, S. Yuasa, N. Mimura, N. Shinozuka, Y. Takada, M. Suzuki, T. Nishino, et al. (2004):** Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol* **24**, 8007-17.
- Hansen, G. H., S. M. Dalskov, C. R. Rasmussen, L. Immerdal, L. L. Niels-Christiansen and E. M. Danielsen (2005):** Cholera-Toxin entry into pig enterocytes occurs via a lipid raft- and clathrin-dependent mechanism. *Biochemistry* **44**, 873-82.
- Harata, N. C., S. Choi, J. L. Pyle, A. M. Aravanis and R. W. Tsien (2006):** Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron* **49**, 243-56.
- Hardwick, K. G., M. J. Lewis, J. Semenza, N. Dean and H. R. Pelham (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.
- Harty, R. N., M. E. Brown, G. Wang, J. Huibregtse and F. P. Hayes (2000):** A PPXY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13871-6.
- Haseloff, J., K. R. Siemerling, D. C. Prasher and S. Hodge (1997):** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2122-7.
- Haugland, R. P. (1995):** Coupling of monoclonal antibodies with enzymes. *Methods Mol Biol* **45**, 235-43.
- Haupts, U., S. Maiti, P. Schwillle and W. W. Webb (1998):** Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13573-8.
- Hayman, G. T. and P. L. Bolen (1991):** Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet* **19**, 389-93.
- Hazes, B. and R. J. Read (1997):** Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* **36**, 11051-4.
- Heiligenstein, S. (2008):** Endozytose, Retrotranslokation und Ubiquitinierung des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Heiligenstein, S., K. Eisfeld, T. Sendzik, N. Jimenez-Becker, F. Breinig and M. J. Schmitt (2006):** Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *Embo J* **25**, 4717-27.

- Helenius, A., D. R. McCaslin, E. Fries and C. Tanford (1979): Properties of detergents. *Methods Enzymol* **56**, 734-49.
- Herman, P. K. and S. D. Emr (1990): Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 6742-54.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1992): The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998): The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79.
- Hessler, J. L. and R. J. Kreitman (1997): An early step in *Pseudomonas* exotoxin action is removal of the terminal lysine residue, which allows binding to the KDEL receptor. *Biochemistry* **36**, 14577-82.
- Hettema, E. H., M. J. Lewis, M. W. Black and H. R. Pelham (2003): Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *Embo J* **22**, 548-57.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Hicke, L. (1997): Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *Faseb J* **11**, 1215-26.
- Hicke, L. (1999): Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**, 107-12.
- Hicke, L. and R. Dunn (2003): Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-72.
- Hicke, L. and H. Riezman (1996): Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**, 277-87.
- Hicke, L., B. Zanolari and H. Riezman (1998): Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* **141**, 349-58.
- Hille-Rehfeld, A. (1995): Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 177-94.
- Hitzeman, R. A., C. Y. Chen, D. J. Dowbenko, M. E. Renz, C. Liu, R. Pai, N. J. Simpson, W. J. Kohr, et al. (1990): Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol* **185**, 421-40.
- Hitzeman, R. A., F. E. Hagie, H. L. Levine, D. V. Goeddel, G. Ammerer and B. D. Hall (1981): Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature* **293**, 717-22.
- Hochuli, E., H. Dobeli and A. Schacher (1987): New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**, 177-84.
- Hodgson, V. J., G. M. Walker and D. Button (1994): A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast. *FEMS Microbiol Lett* **120**, 201-5.
- Hoffman, M. and H. L. Chiang (1996): Isolation of degradation-deficient mutants defective in the targeting of fructose-1,6-bisphosphatase into the vacuole for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **143**, 1555-66.
- Holthuis, J. C., B. J. Nichols and H. R. Pelham (1998): The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Biol Cell* **9**, 3383-97.
- Holtzman, D. A., S. Yang and D. G. Drubin (1993): Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, *SLA1* and *SLA2*, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **122**, 635-44.
- Hong, F., N. Q. Meinander and L. J. Jonsson (2002): Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **79**, 438-49.
- Honing, S., D. Ricotta, M. Krauss, K. Spate, B. Spolaore, A. Motley, M. Robinson, C. Robinson, et al. (2005): Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* **18**, 519-31.
- Horazdovsky, B. F., D. B. DeWald and S. D. Emr (1995): Protein transport to the yeast vacuole. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 544-51.
- Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-8.
- Howard, J. P., J. L. Hutton, J. M. Olson and G. S. Payne (2002): Sla1p serves as the targeting signal recognition factor for NPF_X(1,2)D-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **157**, 315-26.
- Hsu, V. W., N. Shah and R. D. Klausner (1992): A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell* **69**, 625-35.
- Hu, C. D., Y. Chinenov and T. K. Kerppola (2002): Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-98.
- Hua, M. X., Z. Chi, G. L. Liu, M. A. Buzdar and Z. M. Chi (2010): Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles* **14**, 515-21.
- Huang, B. and M. Cai (2007): Pan1p: an actin director of endocytosis in yeast. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1760-4.
- Huang, K. M., K. D'Hondt, H. Riezman and S. K. Lemmon (1999): Clathrin functions in the absence of heterotetrameric adaptors and AP180-related proteins in yeast. *Embo J* **18**, 3897-908.
- Huckaba, T. M., A. C. Gay, L. F. Pantalena, H. C. Yang and L. A. Pon (2004): Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **167**, 519-30.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman and E. K. O'Shea (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-91.
- Hutchins, K. and H. Bussey (1983): Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol* **154**, 161-9.

- Hutter, B. and G. T. John (2004): Evaluation of OxoPlate for real-time assessment of antibacterial activities. *Curr Microbiol* **48**, 57-61.
- Hutterer, A. and J. A. Knoblich (2005): Numb and alpha-adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO rep* **6**, 836-42.
- Idiris, A., H. Tohda, H. Kumagai and K. Takegawa (2010): Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 403-17.
- Idrissi, F. Z., H. Grottsch, I. M. Fernandez-Golbano, C. Presciatto-Baschong, H. Riezman and M. I. Geli (2008): Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *J Cell Biol* **180**, 1219-32.
- Iglewski, B. H., P. V. Liu and D. Kabat (1977): Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* **15**, 138-44.
- Ingmundson, A. and C. R. Roy (2008): Analyzing association of the endoplasmic reticulum with the *Legionella pneumophila*-containing vacuoles by fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* **445**, 379-87.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.
- Iversen, T. G., G. Skretting, A. Llorente, P. Nicoziani, B. van Deurs and K. Sandvig (2001): Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Mol Biol Cell* **12**, 2099-107.
- Jackson, L. P., B. T. Kelly, A. J. McCoy, T. Gaffry, L. C. James, B. M. Collins, S. Honing, P. R. Evans, et al. (2010): A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* **141**, 1220-9.
- Jackson, M. E., J. C. Simpson, A. Girod, R. Pepperkok, L. M. Roberts and J. M. Lord (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.
- Jackson, M. R., T. Nilsson and P. A. Peterson (1990): Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **9**, 3153-62.
- Jacquier, V., M. Prummer, J. M. Segura, H. Pick and H. Vogel (2006): Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14325-30.
- Jadot, M., W. M. Canfield, W. Gregory and S. Kornfeld (1992): Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J Biol Chem* **267**, 11069-77.
- Jahic, M., M. Gustavsson, A. K. Jansen, M. Martinelle and S. O. Enfors (2003): Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J Biotechnol* **102**, 45-53.
- Janson, I. M., R. Toomik, F. O'Farrell and P. Ek (1998): KDEL motif interacts with a specific sequence in mammalian erd2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 447-51.
- Jenness, D. D., A. C. Burkholder and L. H. Hartwell (1986): Binding of alpha-factor pheromone to *Saccharomyces cerevisiae* a cells: dissociation constant and number of binding sites. *Mol Cell Biol* **6**, 318-20.
- Jha, R. K., Z. R. Xu, S. J. Bai, J. Y. Sun, W. F. Li and J. Shen (2007): Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*. *Fish Shellfish Immunol* **22**, 295-307.
- Jiang, J., K. Prasad, E. M. Lafer and R. Sousa (2005): Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* **20**, 513-24.
- Johannes, L. and B. Goud (2000): Facing inward from compartment shores: how many pathways were we looking for? *Traffic* **1**, 119-23.
- Johannes, L. and V. Popoff (2008): Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* **135**, 1175-87.
- Johannes, L. and W. Romer (2010): Shiga-Toxins - from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**, 105-16.
- John, G. T., I. Klimant, C. Wittmann and E. Heinzle (2003): Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnol Bioeng* **81**, 829-36.
- Johnson, K. F., W. Chan and S. Kornfeld (1990): Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 10010-4.
- Jonsdottir, G. A. and R. Li (2004): Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr Biol* **14**, 1604-9.
- Joseph, K. C., A. Stieber and N. K. Gonatas (1979): Endocytosis of Cholera-Toxin in GERL-like structures of murine neuroblastoma cells pretreated with GM1 ganglioside. Cholera-Toxin internalization into Neuroblastoma GERL. *J Cell Biol* **81**, 543-54.
- Kaksonen, M., Y. Sun and D. G. Drubin (2003): A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-87.
- Kaksonen, M., C. P. Toret and D. G. Drubin (2005): A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305-20.
- Kaksonen, M., C. P. Toret and D. G. Drubin (2006): Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 404-14.
- Kang, J. X., J. Bell, R. L. Beard and R. A. Chandraratna (1999): Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor mediates the growth-inhibitory effects of retinoids. *Cell Growth Differ* **10**, 591-600.
- Kee, Y., N. Lyon and J. M. Huibregtse (2005): The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *Embo J* **24**, 2414-24.
- Kee, Y., W. Munoz, N. Lyon and J. M. Huibregtse (2006): The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5-dependent Lys63-linked polyubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**, 36724-31.

- Kelkel, M. (2009):** Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen α -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Kelm, K. B., G. Huyer, J. C. Huang and S. Michaelis (2004):** The internalization of yeast Ste6p follows an ordered series of events involving phosphorylation, ubiquitination, recognition and endocytosis. *Traffic* **5**, 165-80.
- Keppler, A., S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson (2003):** A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nat Biotechnol* **21**, 86-9.
- Keppler, A., M. Kindermann, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson (2004):** Labeling of fusion proteins of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules *in vivo* and *in vitro*. *Methods* **32**, 437-44.
- Keppetipola, N., R. Jain, B. Meineke, M. Diver and S. Shuman (2009):** Structure-activity relationships in *Kluyveromyces lactis* gamma toxin, a eukaryal tRNA anticodon nuclease. *RNA* **15**, 1036-44.
- Kerppola, T. K. (2006):** Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 449-56.
- Kim, K., A. Yamashita, M. A. Wear, Y. Maeda and J. A. Cooper (2004):** Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J Cell Biol* **164**, 567-80.
- Kimata, Y., Y. I. Kimata, Y. Shimizu, H. Abe, I. C. Farcasanu, M. Takeuchi, M. D. Rose and K. Kohno (2003):** Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* **14**, 2559-69.
- Kinal, H., C. M. Park, J. O. Berry, Y. Koltin and J. A. Bruenn (1995):** Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell* **7**, 677-88.
- Kirkham, M. and R. G. Parton (2005):** Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 349-63.
- Kishimoto, T., T. Yamamoto and K. Tanaka (2005):** Defects in structural integrity of ergosterol and the Cdc50p-Drs2p putative phospholipid translocase cause accumulation of endocytic membranes, onto which actin patches are assembled in yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 5592-609.
- Kissa, K., E. Mordelet, C. Soudais, E. J. Kremer, B. A. Demeneix, P. Brulet and L. Coen (2002):** *In vivo* neuronal tracing with GFP-TTC gene delivery. *Mol Cell Neurosci* **20**, 627-37.
- Kitamura, K., T. Kaneko and Y. Yamamoto (1971):** Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. *Arch Biochem Biophys* **145**, 402-4.
- Klassen, R., S. Teichert and F. Meinhardt (2004):** Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Mol Microbiol* **53**, 263-73.
- Klein, S. (2009):** Untersuchungen zur Wirkung und endozytotischen Aufnahme von K28 an Säugerzellen. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Kneen, M., J. Farinas, Y. Li and A. S. Verkman (1998):** Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* **74**, 1591-9.
- Kolling, R. (2002):** Mutations affecting phosphorylation, ubiquitination and turnover of the ABC-transporter Ste6. *FEBS Lett* **531**, 548-52.
- Kolling, R. and C. P. Hollenberg (1994):** The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *Embo J* **13**, 3261-71.
- Koopmann, J. O., J. Albring, E. Huter, N. Bulbuc, P. Spee, J. Neefjes, G. J. Hammerling and F. Momburg (2000):** Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* **13**, 117-27.
- Kounnas, M. Z., R. E. Morris, M. R. Thompson, D. J. FitzGerald, D. K. Strickland and C. B. Saelinger (1992):** The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J Biol Chem* **267**, 12420-3.
- Kozik, P., R. W. Francis, M. N. Seaman and M. S. Robinson (2010):** A screen for endocytic motifs. *Traffic* **11**, 843-55.
- Krsmanovic, T., A. Pawelec, T. Sydor and R. Kolling (2005):** Control of Ste6 recycling by ubiquitination in the early endocytic pathway in yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 2809-21.
- Kubler, E. and H. Riezman (1993):** Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Embo J* **12**, 2855-62.
- Kuismanen, E. and J. Saraste (1989):** Low temperature-induced transport blocks as tools to manipulate membrane traffic. *Methods Cell Biol* **32**, 257-74.
- Kumari, S., V. Borroni, A. Chaudhry, B. Chanda, R. Massol, S. Mayor and F. J. Barrantes (2008):** Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Biol* **181**, 1179-93.
- Kunze, I. I., G. Hensel, K. Adler, J. Bernard, B. Neubohn, C. Nilsson, R. Stoltenburg, S. D. Kohlwein, et al. (1999):** The green fluorescent protein targets secretory proteins to the yeast vacuole. *Biochim Biophys Acta* **1410**, 287-98.
- Kurzweilova, H. and K. Sigler (1993):** Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1. *Folia Microbiol (Praha)* **38**, 524-6.
- Kurzweilova, H. and K. Sigler (1994):** Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. *Arch Microbiol* **162**, 211-4.
- Lai, C. W., D. E. Aronson and E. L. Snapp (2010):** BiP availability distinguishes states of homeostasis and stress in the endoplasmic reticulum of living cells. *Mol Biol Cell* **21**, 1909-21.
- LaMantia, M., T. Miura, H. Tachikawa, H. A. Kaplan, W. J. Lennarz and T. Mizunaga (1991):** Glycosylation site binding protein and protein disulfide isomerase are identical and essential for cell viability in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4453-7.

- Lambrechts, A., K. Gevaert, P. Cossart, J. Vandekerckhove and M. Van Troys (2008): *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol* 18, 220-7.
- Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, P. S. Reinach and O. A. Candia (1979): An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100, 95-7.
- Lauwers, E., Z. Erpapazoglou, R. Haguenauer-Tsapis and B. Andre (2010): The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* 20, 196-204.
- Lee, F. S. and H. M. Hassan (1987): Effect of oxygen tension on stability and expression of a killer toxin chimeric plasmid in a chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27, 72-74.
- Lee, H. I., S. Gal, T. C. Newman and N. V. Raikhel (1993): The *Arabidopsis* endoplasmic reticulum retention receptor functions in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11433-7.
- Lee, J., K. Colwill, V. Aneliunas, C. Tennyson, L. Moore, Y. Ho and B. Andrews (1998): Interaction of yeast Rvs167 and Pho85 cyclin-dependent kinase complexes may link the cell cycle to the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 8, 1310-21.
- Lee, S. Y., M. S. Lee, R. P. Cherla and V. L. Tesh (2008): Shiga-Toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell Microbiol* 10, 770-80.
- Lencer, W. I., C. Constable, S. Moe, M. G. Jobling, H. M. Webb, S. Ruston, J. L. Madara, T. R. Hirst, et al. (1995): Targeting of Cholera-Toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 131, 951-62.
- Lencer, W. I., T. R. Hirst and R. K. Holmes (1999): Membrane traffic and the cellular uptake of Cholera-Toxin. *Biochim Biophys Acta* 1450, 177-90.
- Lenk, U. and T. Sommer (2000): Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *J Biol Chem* 275, 39403-10.
- Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman and P. Cosson (1994): Coatmer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79, 1199-207.
- Lewis, M. J., B. J. Nichols, C. Prescianotto-Baschong, H. Riezman and H. R. Pelham (2000): Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* 11, 23-38.
- Lewis, M. J. and H. R. Pelham (1990): A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-3.
- Lewis, M. J. and H. R. Pelham (1992): Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-64.
- Lewis, M. J., D. J. Sweet and H. R. Pelham (1990): The *ERD2* gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61, 1359-63.
- Li, P., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangovan, V. V. Suzara, N. Duzgunes and V. Renugopalakrishnan (2007): Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 142, 105-24.
- Li, Z., F. Xiong, Q. Lin, M. d'Anjou, A. J. Daugulis, D. S. Yang and C. L. Hew (2001): Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 21, 438-45.
- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2004): A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-40.
- Lim, C. R., Y. Kimata, M. Oka, K. Nomaguchi and K. Kohno (1995): Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1. *J Biochem* 118, 13-7.
- Lin-Cereghino, J., W. W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L. T. Luong, J. Vu, S. D. Johnson and G. P. Lin-Cereghino (2005): Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques* 38, 44, 46, 48.
- Lin, C. H., J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan and S. D. Emr (2008): Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-25.
- Lind, M. (2010): Struktur und Funktionsuntersuchungen von Zygocin - ein kanalbildendes Proteintoxin mit antimykotischem Potential. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Lipson, R. S., K. J. Webb and S. G. Clarke (2010): Two novel methyltransferases acting upon eukaryotic elongation factor 1A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 500, 137-43.
- Liu, J., A. Sitaram and C. G. Burd (2007): Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* 8, 1375-84.
- Liu, Q., J. Zhan, X. Chen and S. Zheng (2006): Ricin A chain reaches the endoplasmic reticulum after endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 857-63.
- Loibl, M., G. Grossmann, V. Stradalova, A. Klingl, R. Rachel, W. Tanner, J. Malinsky and M. Opekarova (2010): C terminus of Nce102 determines the structure and function of microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane. *Eukaryot Cell* 9, 1184-92.
- Lombardi, R. and H. Riezman (2001): Rvs161p and Rvs167p, the two yeast amphiphysin homologs, function together *in vivo*. *J Biol Chem* 276, 6016-22.
- Lord, J. M., L. M. Roberts and W. I. Lencer (2005): Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Curr Top Microbiol Immunol* 300, 149-68.
- Lu, J., B. Huang, A. Esberg, M. J. Johansson and A. S. Byström (2005): The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* 11, 1638-54.
- Luo, G., A. Gruhler, Y. Liu, O. N. Jensen and R. C. Dickson (2008): The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J Biol Chem* 283, 10433-44.
- Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil and L. M. Harvey (2005): Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249-70.

- MacDonald, P. E., L. Eliasson and P. Rorsman (2005):** Calcium increases endocytotic vesicle size and accelerates membrane fission in insulin-secreting INS-1 cells. *J Cell Sci* **118**, 5911-20.
- Madania, A., P. Dumoulin, S. Grava, H. Kitamoto, C. Scharer-Brodbeck, A. Souldard, V. Moreau and B. Winsor (1999):** The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell* **10**, 3521-38.
- Madeo, F., M. Durchschlag, O. Kepp, T. Panaretakis, L. Zitvogel, K. U. Frohlich and G. Kroemer (2009):** Phylogenetic conservation of the preapoptotic calreticulin exposure pathway from yeast to mammals. *Cell Cycle* **8**, 639-42.
- Magliani, W., S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti and L. Polonelli (1997):** Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* **10**, 369-400.
- Majoul, I. (2004):** Analysing the action of bacterial toxins in living cells with fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Int J Med Microbiol* **293**, 495-503.
- Majoul, I. V., P. I. Bastiaens and H. D. Soling (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.
- Malinska, K., J. Malinsky, M. Opekarova and W. Tanner (2003):** Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* **14**, 4427-36.
- Malinska, K., J. Malinsky, M. Opekarova and W. Tanner (2004):** Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci* **117**, 6031-41.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud and L. Johannes (1998):** Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga-Toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* **143**, 973-90.
- Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis and D. Urban-Grimal (1998):** A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* **18**, 314-21.
- Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis and D. Urban-Grimal (2000):** Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J Biol Chem* **275**, 23608-14.
- Markgraf, D. F., F. Ahnert, H. Arlt, M. Mari, K. Peplowska, N. Epp, J. Griffith, F. Reggiori, et al. (2009):** The CORVET subunit Vps8 cooperates with the Rab5 homolog Vps21 to induce clustering of late endosomal compartments. *Mol Biol Cell* **20**, 5276-89.
- Martin-Granados, C., S. P. Riechers, U. Stahl and C. Lang (2008):** Absence of See1p, a widely conserved *Saccharomyces cerevisiae* protein, confers both deficient heterologous protein production and endocytosis. *Yeast* **25**, 871-7.
- Martinac, B., H. Zhu, A. Kubalski, X. L. Zhou, M. Culbertson, H. Bussey and C. Kung (1990):** Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6228-32.
- Martinez-Ruiz, A., A. Martinez del Pozo, J. Lacadena, J. M. Mancheno, M. Onaderra, C. Lopez-otin and J. G. Gavilanes (1998):** Secretion of recombinant pro- and mature fungal alpha-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr Purif* **12**, 315-22.
- Martinez, E., J. Morales, J. Aguiar, M. Pineda, M. Izquierdo and G. Ferbeyre (1992):** Cloning and expression of hepatitis B surface antigen in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Lett* **14**, 83-86.
- Mathew, E., A. Bajaj, S. M. Connelly, H. Sargsyan, F. X. Ding, A. G. Hajduczuk, F. Naider and M. E. Dumont (2011):** Differential interactions of fluorescent agonists and antagonists with the yeast G protein coupled receptor Ste2p. *J Mol Biol* **409**, 513-28.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaisky, M. L. Markelov and S. A. Lukyanov (1999):** Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* **17**, 969-73.
- Mayer, A., R. J. Francis, S. K. Sharma, B. Tolner, C. J. Springer, J. Martin, G. M. Boxer, J. Bell, et al. (2006):** A phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFCEP1 and a bis-iodo phenol mustard prodrug. *Clin Cancer Res* **12**, 6509-16.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (2005):** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670-84.
- Mayson, B. E., D. G. Kilburn, B. L. Zamost, C. K. Raymond and G. J. Lesnicki (2003):** Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol Bioeng* **81**, 291-8.
- McKenzie, J., L. Johannes, T. Taguchi and D. Sheff (2009):** Passage through the Golgi is necessary for Shiga-Toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. *FEBS J* **276**, 1581-95.
- McMurray, M. A. and J. Thorner (2008):** Septin stability and recycling during dynamic structural transitions in cell division and development. *Curr Biol* **18**, 1203-8.
- Meaden, P., K. Hill, J. Wagner, D. Slipetz, S. S. Sommer and H. Bussey (1990):** The yeast *KRE5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1→6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol* **10**, 3013-9.
- Mehlgarten, C. and R. Schaffrath (2003):** Mutant casein kinase I (Hrr25p/Kti14p) abrogates the G1 cell cycle arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin in budding yeast. *Mol Genet Genomics* **269**, 188-96.
- Meijering, E., O. Dzyubachyk, I. Smal and W. A. van Cappellen (2009):** Tracking in cell and developmental biology. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 894-902.
- Mellman, I., R. Fuchs and A. Helenius (1986):** Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700.

- Mellman, I. and H. Plutner (1984):** Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. *J Cell Biol* 98, 1170-7.
- Merico, A., D. Capitanio, I. Vigentini, B. M. Ranzi and C. Compagno (2004):** How physiological and cultural conditions influence heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. *J Biotechnol* 109, 139-46.
- Michalet, X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, et al. (2005):** Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* 307, 538-44.
- Michelot, A., M. Costanzo, A. Sarkeshik, C. Boone, J. R. Yates, 3rd and D. G. Drubin (2010):** Reconstitution and protein composition analysis of endocytic actin patches. *Curr Biol* 20, 1890-9.
- Miesenbock, G. and J. E. Rothman (1995):** The capacity to retrieve escaped ER proteins extends to the trans-most cisterna of the Golgi stack. *J Cell Biol* 129, 309-19.
- Misra, S., G. J. Miller and J. H. Hurley (2001):** Recognizing phosphatidylinositol 3-phosphate. *Cell* 107, 559-62.
- Mitsunari, T., F. Nakatsu, N. Shioda, P. E. Love, A. Grinberg, J. S. Bonifacino and H. Ohno (2005):** Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol* 25, 9318-23.
- Mittal, R. and H. T. McMahon (2009):** Arrestins as adaptors for ubiquitination in endocytosis and sorting. *EMBO Rep* 10, 41-3.
- Moayeri, M. and S. H. Leppla (2009):** Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med* 30, 439-55.
- Mori, S., C. H. Heldin and L. Claesson-Welsh (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. and C. B. Saelinger (1983):** Diphtheria toxin does not enter resistant cells by receptor-mediated endocytosis. *Infect Immun* 42, 812-7.
- Morvan, J., M. Froissard, R. Haguenauer-Tsapis and D. Urban-Grimal (2004):** The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies. *Traffic* 5, 383-92.
- Motizuki, M., S. Yokota and K. Tsurugi (2008):** Effect of low pH on organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1780, 179-84.
- Motley, A., N. A. Bright, M. N. Seaman and M. S. Robinson (2003):** Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 162, 909-18.
- Motley, A. M., N. Berg, M. J. Taylor, D. A. Sahlender, J. Hirst, D. J. Owen and M. S. Robinson (2006):** Functional analysis of AP-2 alpha and mu2 subunits. *Mol Biol Cell* 17, 5298-308.
- Moya, M., A. Dautry-Varsat, B. Goud, D. Louvard and P. Boquet (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.
- Mukhopadhyay, D. and H. Riezman (2007):** Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201-5.
- Munn, A. L. (2000):** The yeast endocytic membrane transport system. *Microsc Res Tech* 51, 547-62.
- Munn, A. L. (2001):** Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1535, 236-57.
- Munn, A. L. and H. Riezman (1994):** Endocytosis is required for the growth of vacuolar H⁺-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* 127, 373-86.
- Munn, A. L., B. J. Stevenson, M. I. Geli and H. Riezman (1995):** *end5*, *end6*, and *end7*: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 6, 1721-42.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987):** A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Murasugi, A. and Y. Tohma-Aiba (2001):** Comparison of three signals for secretory expression of recombinant human midkine in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2291-3.
- Nakajima, T. and C. E. Ballou (1974):** Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J Biol Chem* 249, 7685-94.
- Napier, R. M., L. C. Fowke, C. Hawes, M. Lewis and H. R. Pelham (1992):** Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 102, 261-71.
- Natalello, A., R. Santarella, S. M. Doglia and A. de Marco (2008):** Physical and chemical perturbations induce the formation of protein aggregates with different structural features. *Protein Expr Purif* 58, 356-61.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988):** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-62.
- Neumeyer, T., F. Tonello, F. Dal Molin, B. Schiffler and R. Benz (2006):** Anthrax edema factor, voltage-dependent binding to the protective antigen ion channel and comparison to LF binding. *J Biol Chem* 281, 32335-43.
- Newpher, T. M. and S. K. Lemmon (2006):** Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* 7, 574-88.
- Newpher, T. M., R. P. Smith, V. Lemmon and S. K. Lemmon (2005):** *In vivo* dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell* 9, 87-98.
- Nguyen, S. V. (2007):** Investigations on the optimization of the soluble production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Dissertation, Universität Halle-Wittenberg*.
- Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair and J. Lippincott-Schwartz (2001):** Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* 153, 529-41.
- Nikko, E. and B. Andre (2007):** Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic* 8, 566-81.
- Nikko, E. and H. R. Pelham (2009):** Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 10, 1856-67.

- Nikko, E., J. A. Sullivan and H. R. Pelham (2008):** Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep* **9**, 1216-21.
- Niwa, H., S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi and F. I. Tsuji (1996):** Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13617-22.
- Nofal, S., U. Becherer, D. Hof, U. Matti and J. Rettig (2007):** Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci* **27**, 1386-95.
- Normington, K., K. Kohno, Y. Kozutsumi, M. J. Gething and J. Sambrook (1989):** *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* **57**, 1223-36.
- Novotna, D., H. Flegelova and B. Janderova (2004):** Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**, 803-13.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, et al. (2007):** Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**, 54-61.
- Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, et al. (1995):** Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-5.
- Okreglak, V. and D. G. Drubin (2007):** Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J Cell Biol* **178**, 1251-64.
- Olson, L. J., O. Hindsgaul, N. M. Dahms and J. J. Kim (2008):** Structural insights into the mechanism of pH-dependent ligand binding and release by the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* **283**, 10124-34.
- Olusanya, O., P. D. Andrews, J. R. Swedlow and E. Smythe (2001):** Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis *in vitro* and *in vivo*. *Curr Biol* **11**, 896-900.
- Orci, L., M. Stamnes, M. Ravazzola, M. Amherdt, A. Perrelet, T. H. Sollner and J. E. Rothman (1997):** Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-49.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington (1996):** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-5.
- Osumi, M. (1998):** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**, 207-33.
- Owen, D. J., Y. Vallis, B. M. Pearse, H. T. McMahon and P. R. Evans (2000):** The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *Embo J* **19**, 4216-27.
- Paiva, S., N. Vieira, I. Nondier, R. Haguener-Tsapis, M. Casal and D. Urban-Grimal (2009):** Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *J Biol Chem* **284**, 19228-36.
- Palermo, M. S., R. A. Exeni and G. C. Fernandez (2009):** Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**, 697-707.
- Palmer, E. and T. Freeman (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.
- Panchuk-Voloshina, N., R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W. Y. Leung and R. P. Haugland (1999):** Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* **47**, 1179-88.
- Panek, H. R., J. D. Stepp, H. M. Engle, K. M. Marks, P. K. Tan, S. K. Lemmon and L. C. Robinson (1997):** Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *Embo J* **16**, 4194-204.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, et al. (2007):** p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**, 24131-45.
- Pantazaka, E. and C. W. Taylor (2011):** Differential distribution, clustering, and lateral diffusion of subtypes of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* **286**, 23378-87.
- Park, C. M., J. O. Berry and J. A. Bruenn (1996):** High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* **30**, 359-66.
- Park, C. M., J. A. Bruenn, C. Ganesa, W. F. Flurkey, R. F. Bozarth and Y. Koltin (1994):** Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol* **11**, 155-64.
- Parks, L. W., S. J. Smith and J. H. Crowley (1995):** Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast--a review. *Lipids* **30**, 227-30.
- Pasche, M (2009):** Gleichzeitige Beobachtung der Exozytose in Chromaffinzellen mit einer Kombination von Interner Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie und Membrankapazitätsmessung. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Patterson, G. H., S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain and D. W. Piston (1997):** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**, 2782-90.
- Payne, G. S., D. Baker, E. van Tuinen and R. Schekman (1988):** Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain-deficient yeast. *J Cell Biol* **106**, 1453-61.
- Pearse, B. M. (1975):** Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* **97**, 93-8.
- Pearse, B. M. and M. S. Bretscher (1981):** Membrane recycling by coated vesicles. *Annu Rev Biochem* **50**, 85-101.
- Pearse, B. M., C. J. Smith and D. J. Owen (2000):** Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 220-8.
- 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., K. G. Hardwick and M. J. Lewis (1988):** Sorting of soluble ER proteins in yeast. *Embo J* **7**, 1757-62.

- Perez, F., M. Ramirez and J. A. Regodon (2001):** Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**, 393-9.
- Peter, B. J., H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. Butler, P. R. Evans and H. T. McMahon (2004):** BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-9.
- Petranovic, D., K. Tyo, G. N. Vemuri and J. Nielsen (2010):** Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Res* **10**, 1046-59.
- Petty, H. R. (2007):** Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microsc Res Tech* **70**, 687-709.
- Peyroche, A., B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils and C. L. Jackson (1999):** Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* **3**, 275-85.
- Pfeiffer, P. and F. Radler (1982):** Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol* **128**, 2699-2706.
- Pflugger, S. L., H. V. Goodson, J. M. Moran, C. J. Ruggiero, X. Ye, K. M. Emmons and K. M. Hager (2005):** Receptor for retrograde transport in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **4**, 432-42.
- Piao, H. L., I. M. Machado and G. S. Payne (2007):** NPFXD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol Biol Cell* **18**, 57-65.
- Pilon, M., R. Schekman and K. Romisch (1997):** Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J* **16**, 4540-8.
- Pinaud, F., X. Michalet, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Iyer and S. Weiss (2006):** Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials* **27**, 1679-87.
- Polonelli, L., S. Conti, M. Gerloni, W. Magliani, C. Chezzi and G. Morace (1991):** Interfaces of the yeast killer phenomenon. *Crit Rev Microbiol* **18**, 47-87.
- Polonelli, L., R. Lorenzini, F. De Bernardis and G. Morace (1986):** Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia* **96**, 103-7.
- Polonelli, L. and G. Morace (1986):** Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* **24**, 866-9.
- Popoff, V., G. A. Mardones, D. Tenza, R. Rojas, C. Lamaze, J. S. Bonifacino, G. Raposo and L. Johannes (2007):** The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J Cell Sci* **120**, 2022-31.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier (1992):** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-33.
- Pringle, J. R. (1991):** Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol* **194**, 732-5.
- Prosser, D. C., K. Whitworth and B. Wendland (2010):** Quantitative analysis of endocytosis with cytoplasmic pHluorin chimeras. *Traffic* **11**, 1141-50.
- Pulvirenti, T., M. Giannotta, M. Capestrano, M. Capitani, A. Pisanu, R. S. Polishchuk, E. San Pietro, G. V. Beznoussenko, et al. (2008):** A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nat Cell Biol* **10**, 912-22.
- Rahimi, Y., A. Goulding, S. Shrestha, S. Mirpuri and S. K. Deo (2008):** Mechanism of copper induced fluorescence quenching of red fluorescent protein, DsRed. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 57-61.
- Rahimi, Y., S. Shrestha and S. K. Deo (2007):** Metal Affinity-Based Purification of a Red Fluorescent Protein. *Chromatographia* **65**, 429-433.
- Rakestraw, J. A., S. L. Sazinsky, A. Piatasi, E. Antipov and K. D. Wittrup (2009):** Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **103**, 1192-201.
- Rao, P. V., R. Jayaraj, A. S. Bhaskar, O. Kumar, R. Bhattacharya, P. Saxena, P. K. Dash and R. Vijayaraghavan (2005):** Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochem Pharmacol* **69**, 855-65.
- Rapak, A., P. O. Falnes and S. Olsnes (1997):** Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3783-8.
- Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz and H. Riezman (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., H. Alanen, K. Salo, J. Jurvansuu, V. D. Nguyen, M. Latva-Ranta and L. Ruddock (2007):** A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* **179**, 1193-204.
- Rea, S. L., B. H. Graham, E. Nakamaru-Ogiso, A. Kar and M. J. Falk (2010):** Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev Disabil Res Rev* **16**, 200-18.
- Reaves, B. and G. Banting (1994):** Overexpression of TGN38/41 leads to mislocalisation of gamma-adaptin. *FEBS Lett* **351**, 448-56.
- Redding, K., C. Holcomb and R. S. Fuller (1991):** Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **113**, 527-38.
- Reider, A., S. L. Barker, S. K. Mishra, Y. J. Im, L. Maldonado-Baez, J. H. Hurley, L. M. Traub and B. Wendland (2009):** Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *Embo J* **28**, 3103-16.
- Reiter, J. (2004):** Untersuchungen zur Wirkungsweise eines viralen A/B-Toxins der Hefe: Kernlokalisation, Apoptose und Zellzyklusarrest. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Reiter, J., E. Herker, F. Madeo and M. J. Schmitt (2005):** Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **168**, 353-8.
- Remington, S. J. (2006):** Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 714-21.

- Ren, G., P. Vajjhala, J. S. Lee, B. Winsor and A. L. Munn (2006): The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 37-120.
- Ricotta, D., S. D. Conner, S. L. Schmid, K. von Figura and S. Honing (2002): Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* **156**, 791-5.
- Riederer, M. A., T. Soldati, A. D. Shapiro, J. Lin and S. R. Pfeffer (1994): Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **125**, 573-82.
- Riezman, H. (1993): Yeast endocytosis. *Trends Cell Biol* **3**, 273-7.
- Riffer, F., K. Eisfeld, F. Breinig and M. J. Schmitt (2002): Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **148**, 1317-28.
- Robertson, A. S., E. Smythe and K. R. Ayscough (2009): Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2049-65.
- Robinson, J. S., D. J. Klionsky, L. M. Banta and S. D. Emr (1988): Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **8**, 4936-48.
- Robinson, L. C., E. J. Hubbard, P. R. Graves, A. A. DePaoli-Roach, P. J. Roach, C. Kung, D. W. Haas, C. H. Hagedorn, et al. (1992): Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 28-32.
- Robinson, L. C., M. M. Menold, S. Garrett and M. R. Culbertson (1993): Casein kinase I-like protein kinases encoded by *YCK1* and *YCK2* are required for yeast morphogenesis. *Mol Cell Biol* **13**, 2870-81.
- Rodal, A. A., A. L. Manning, B. L. Goode and D. G. Drubin (2003): Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins. *Curr Biol* **13**, 1000-8.
- Rodriguez-Cousino, N., M. Maqueda, J. Ambrona, E. Zamora, R. Esteban and M. Ramirez (2011): A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1822-32.
- Rogel, A. and E. Hanski (1992): Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem* **267**, 22599-605.
- Romanos, M. A., J. J. Clare, K. M. Beesley, F. B. Rayment, S. P. Ballantine, A. J. Makoff, G. Dougan, N. F. Fairweather, et al. (1991): Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**, 901-6.
- Romanos, M. A., A. J. Makoff, N. F. Fairweather, K. M. Beesley, D. E. Slater, F. B. Rayment, M. M. Payne and J. J. Clare (1991): Expression of Tetanus-Toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res* **19**, 1461-7.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer and J. J. Clare (1992): Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-88.
- Rose, M. D., L. M. Misra and J. P. Vogel (1989): *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* **57**, 1211-21.
- Rosenberg, A. H. and F. W. Studier (1987): T7 RNA polymerase can direct expression of influenza virus cap-binding protein (PB2) in *Escherichia coli*. *Gene* **59**, 191-200.
- Roth, A. F. and N. G. Davis (1996): Ubiquitination of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* **134**, 661-74.
- Roth, A. F. and N. G. Davis (2000): Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. *J Biol Chem* **275**, 8143-53.
- Roth, A. F., Y. Feng, L. Chen and N. G. Davis (2002): The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J Cell Biol* **159**, 23-8.
- Roth, T. F. and K. R. Porter (1964): Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *J Cell Biol* **20**, 313-32.
- Rothstein, R. J. (1983): One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202-11.
- Rotin, D. and S. Kumar (2009): Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 398-409.
- Rubino, S., P. Cappuccinelli and D. J. Kelvin (2011): *Escherichia coli* (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. *J Infect Dev Ctries* **5**, 437-40.
- Rudolph, R., S. Fischer and R. Mattes (1985a): Process for the activation of t-PA after expression in procaryotic cells. *German patent DE3537708*.
- Rudolph, R., S. Fischer and R. Mattes (1985b): Process for activating heterologous, eucaryotic proteins genetically engineered and presenting disulphide bridges after their expression in procaryotic cells. *European patent P3537708.9*.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Salcini, A. E., S. Confalonieri, M. Doria, E. Santolini, E. Tassi, O. Minenkova, G. Cesareni, P. G. Pelicci, et al. (1997): Binding specificity and *in vivo* targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes Dev* **11**, 2239-49.
- Salek, A. T. (2003): Influence of yeast killer toxins on the cytotoxicity of Shiga-like toxins. *Biotechnologia* **1**, 244-256.
- Sallese, M., M. Giannotta and A. Luini (2009): Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 801-9.
- Sallese, M., T. Pulvirenti and A. Luini (2006): The physiology of membrane transport and endomembrane-based signalling. *Embo J* **25**, 2663-73.
- Sandvig, K. (2001): Shiga-Toxins. *Toxicon* **39**, 1629-35.
- Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen and B. van Deurs (1992): Retrograde transport of endocytosed Shiga-Toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**, 510-2.
- Sandvig, K. and S. Olsnes (1981): Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. Characterization of the entry process and effects of low pH on the toxin molecule. *J Biol Chem* **256**, 9068-76.

- Sandvig, K., S. Olsnes, J. E. Brown, O. W. Petersen and B. van Deurs (1989): Endocytosis from coated pits of Shiga-Toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol* 108, 1331-43.
- Sandvig, K., K. Prydz, M. Ryd and B. van Deurs (1991): Endocytosis and intracellular transport of the glycolipid-binding ligand Shiga-Toxin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 113, 553-62.
- Sandvig, K., M. L. Torgersen, N. Engedal, T. Skotland and T. G. Iversen (2010): Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett* 584, 2626-34.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (1996): Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga-Toxin and ricin. *Physiol Rev* 76, 949-66.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (2000): Entry of ricin and Shiga-Toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *Embo J* 19, 5943-50.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (2002): Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, Cholera-Toxin and Shiga-Toxin. *FEBS Lett* 529, 49-53.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (2005): Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* 12, 865-72.
- Santos, A., M. San Mauro, E. Bravo and D. Marquina (2009): PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155, 624-34.
- Schaffrath, R. and K. D. Breunig (2000): Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* 30, 173-90.
- Schägger, H. and G. Jagow (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.
- Schandel, K. A. and D. D. Jenness (1994): Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol Cell Biol* 14, 7245-55.
- Schäuble, N. (2008): Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zur Identifizierung von *in vivo* Interaktionspartnern des viralen K28 Toxins in Hefe. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Scheel, A. A. and H. R. Pelham (1998): Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J Biol Chem* 273, 2467-72.
- Scheffner, M., U. Nuber and J. M. Huibregtse (1995): Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-3.
- Scherer, S. and R. W. Davis (1979): Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4951-5.
- Schermelleh, L., P. M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M. C. Cardoso, et al. (2008): Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* 320, 1332-6.
- Schiavo, G. and F. G. van der Goot (2001): The bacterial toxin toolkit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 530-7.
- Schiestl, R. H. and R. D. Gietz (1989): High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-46.
- Schmitt, M. and F. Radler (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 F. Radler (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 F. Breinig (2002): The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26, 257-76.
- Schmitt, M. J. and F. Breinig (2006): Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol* 4, 212-21.
- Schmitt, M. J., M. Brendel, R. Schwarz and F. Radler (1989): Inhibition of DNA synthesis in *S. cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. *J Gen Microbiol* 135, 1529-1535.
- Schmitt, M. J., P. Klavehn, J. Wang, I. Schonig and D. J. Tipper (1996): Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology* 142, 2655-62.
- Schmitt, M. J., O. Poravou, K. Trenz and K. Rehfeldt (1997): Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J Virol* 71, 8852-5.
- Schmitt, M. J. and J. Reiter (2008): Viral induced yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1413-7.
- Schmitt, M. J. and D. J. Tipper (1990): K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 4807-15.
- Schmitt, M. J. and D. J. Tipper (1992): Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast* 8, 373-84.
- Schmitt, M. J. and D. J. Tipper (1995): Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology* 213, 341-51.
- Schmitz, A., H. Herrgen, A. Winkeler and V. Herzog (2000): Cholera-Toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148, 1203-12.
- Schuldiner, M., S. R. Collins, N. J. Thompson, V. Denic, A. Bhamidipati, T. Punna, J. Ihmels, B. Andrews, et al. (2005): Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507-19.
- Schuster, M., R. Lipowsky, M. A. Assmann, P. Lenz and G. Steinberg (2011): Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3618-23.
- Schutze, M. P., P. A. Peterson and M. R. Jackson (1994): An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 13, 1696-705.

- Schwartz, A. L., G. J. Strous, J. W. Slot and H. J. Geuze (1985):** Immunoelectron microscopic localization of acidic intracellular compartments in hepatoma cells. *Embo J* **4**, 899-904.
- Sciaky, N., J. Presley, C. Smith, K. J. Zaal, N. Cole, J. E. Moreira, M. Terasaki, E. Siggia, et al. (1997):** Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* **139**, 1137-55.
- Seaman, M. N., J. M. McCaffery and S. D. Emr (1998):** A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol* **142**, 665-81.
- Sehn, M. (2005):** Phäno- und genotypische Charakterisierung eines aus Wein isolierten Killerstammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit, Universität des Saarlandes*.
- Sekine-Aizawa, Y. and R. L. Haganir (2004):** Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17114-9.
- Sekiya-Kawasaki, M., A. C. Groen, M. J. Cope, M. Kaksonen, H. A. Watson, C. Zhang, K. M. Shokat, B. Wendland, et al. (2003):** Dynamic phosphoregulation of the cortical actin cytoskeleton and endocytic machinery revealed by real-time chemical genetic analysis. *J Cell Biol* **162**, 765-72.
- Selitrennikoff, C. P. (2001):** Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2883-94.
- Semenza, J. C., K. G. Hardwick, N. Dean and H. R. Pelham (1990):** *ERD2*, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**, 1349-57.
- Sendzik, T. (2006):** Identifizierung essentieller Komponenten des intrazellulären Transports eines viralen A/B-Toxins der Hefe. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Sevrieva, I. (2009):** Colocalization studies of the cellular HDEL-receptor Erd2p in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Master thesis, Universität des Saarlandes*.
- Sha, B., S. Lee and D. M. Cyr (2000):** The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. *Structure* **8**, 799-807.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer and R. Y. Tsien (2004):** Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-72.
- Shaner, N. C., G. H. Patterson and M. W. Davidson (2007):** Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**, 4247-60.
- Shaner, N. C., P. A. Steinbach and R. Y. Tsien (2005):** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-9.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela and J. V. Maizel, Jr. (1967):** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-20.
- Sharma, S. K., R. B. Pedley, J. Bhatia, G. M. Boxer, E. El-Emir, U. Qureshi, B. Tolner, H. Lowe, et al. (2005):** Sustained tumor regression of human colorectal cancer xenografts using a multifunctional mannosylated fusion protein in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Clin Cancer Res* **11**, 814-25.
- Shaw, J. D., K. B. Cummings, G. Huyer, S. Michaelis and B. Wendland (2001):** Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp Cell Res* **271**, 1-9.
- Shearwin-Whyatt, L., H. E. Dalton, N. Foot and S. Kumar (2006):** Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays* **28**, 617-28.
- Shenoy, S. K., K. Xiao, V. Venkataraman, P. M. Snyder, N. J. Freedman and A. M. Weissman (2008):** Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **283**, 22166-76.
- Shi, X., T. Karkut, M. Chamankhah, M. Alting-Mees, S. M. Hemmingsen and D. Hegedus (2003):** Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **28**, 321-30.
- Shih, S. C., D. J. Katzmann, J. D. Schnell, M. Sutanto, S. D. Emr and L. Hicke (2002):** Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **4**, 389-93.
- Shim, J. and J. Lee (2000):** Molecular genetic analysis of *apm-2* and *aps-2*, genes encoding the medium and small chains of the AP-2 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* **10**, 309-16.
- Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga (1962):** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-39.
- Shiratori, T., S. Miyatake, H. Ohno, C. Nakaseko, K. Isono, J. S. Bonifacino and T. Saito (1997):** Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* **6**, 583-9.
- Shuman, S. (1994):** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**, 32678-84.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989):** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Simons, J. F., S. Ferro-Novick, M. D. Rose and A. Helenius (1995):** BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J Cell Biol* **130**, 41-9.
- Simpson, J. C., L. M. Roberts, K. Romisch, J. Davey, D. H. Wolf and J. M. Lord (1999):** Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett* **459**, 80-4.
- Simpson, J. C., D. C. Smith, L. M. Roberts and J. M. Lord (1998):** Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp Cell Res* **239**, 293-300.
- Singh, P., B. L. Tang, S. H. Wong and W. Hong (1993):** Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Mol Cell Biol* **13**, 6435-41.

- Sinha, P., J. Poland, M. Schnolzer and T. Rabilloud (2001):** A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **1**, 835-40.
- Sivadon, P., F. Bauer, M. Aigle and M. Crouzet (1995):** Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast *rvs161* mutant: the Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol Gen Genet* **246**, 485-95.
- Skretting, G., M. L. Torgersen, B. van Deurs and K. Sandvig (1999):** Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor. *J Cell Sci* **112** (22), 3899-909.
- Slagowski, N. L., R. W. Kramer, M. F. Morrison, J. LaBaer and C. F. Lesser (2008):** A functional genomic yeast screen to identify pathogenic bacterial proteins. *PLoS Pathog* **4**, e9.
- Slepnev, V. I. and P. De Camilli (2000):** Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* **1**, 161-72.
- Smaczynska-de, R., II, E. G. Allwood, S. Aghamohammadzadeh, E. H. Hettema, M. W. Goldberg and K. R. Ayscough (2010):** A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J Cell Sci* **123**, 3496-506.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, et al. (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Smythe, E. and K. R. Ayscough (2003):** The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin skeleton. *EMBO Rep* **4**, 246-51.
- Sokalowski, R. (1998):** Expression und Charakterisierung des c-Myb Protoonkogenprodukts. *Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover*.
- Song, B. D. and S. L. Schmid (2003):** A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* **42**, 1369-76.
- Sorkin, A. (2004):** Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 392-9.
- Spence, J., S. Sadis, A. L. Haas and D. Finley (1995):** A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**, 1265-73.
- Spindler, J. (2004):** Untersuchungen zur endocytotischen Aufnahme und intrazellulären Expression von K28-Toxinderivaten in Hefe- und Säugerzellen. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Stack, J. H., P. K. Herman, P. V. Schu and S. D. Emr (1993):** A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *Embo J* **12**, 2195-204.
- Stack, J. H., B. Horazdovsky and S. D. Emr (1995):** Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 1-33.
- Stamenova, S. D., M. E. French, Y. He, S. A. Francis, Z. B. Kramer and L. Hicke (2007):** Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains. *Mol Cell* **25**, 273-84.
- Starmer, W. T., P. F. Ganter, V. Aberdeen, M. A. Lachance and H. J. Phaff (1987):** The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol* **33**, 783-96.
- Staub, O., S. Dho, P. Henry, J. Correa, T. Ishikawa, J. McGlade and D. Rotin (1996):** WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *Embo J* **15**, 2371-80.
- Staub, O. and D. Rotin (2006):** Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* **86**, 669-707.
- Stechmann, B., S. K. Bai, E. Gobbo, R. Lopez, G. Merer, S. Pinchard, L. Panigai, D. Tenza, et al. (2010):** Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge. *Cell* **141**, 231-42.
- Steel, G. J., D. M. Fullerton, J. R. Tyson and C. J. Stirling (2004):** Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science* **303**, 98-101.
- Stefan, C. J. and K. J. Blumer (1999):** A syntaxin homolog encoded by VAM3 mediates down-regulation of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **274**, 1835-41.
- Stefan, C. J., A. G. Manford, D. Baird, J. Yamada-Hanff, Y. Mao and S. D. Emr (2011):** Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell* **144**, 389-401.
- Stefan, C. J., S. M. Padilla, A. Audhya and S. D. Emr (2005):** The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol* **25**, 2910-23.
- Steffen, W., A. C. Gemperli, N. Cveticic and J. Steuber (2010):** Organelle-specific expression of subunit ND5 of human complex I (NADH dehydrogenase) alters cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **10**, 648-59.
- Steiner, D. F., S. P. Smeekens, S. Ohagi and S. J. Chan (1992):** The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem* **267**, 23435-8.
- Steinman, R. M., I. S. Mellman, W. A. Muller and Z. A. Cohn (1983):** Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* **96**, 1-27.
- Steyer, J. A. and W. Almers (2001):** A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 268-75.
- Stimpson, H. E., C. P. Toret, A. T. Cheng, B. S. Pauly and D. G. Drubin (2009):** Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 4640-51.
- Stradalova, V., W. Stahlschmidt, G. Grossmann, M. Blazikova, R. Rachel, W. Tanner and J. Malinsky (2009):** Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci* **122**, 2887-94.
- Stratton, J., V. Chiruvolu and M. Meagher (1998):** High cell-density fermentation. *Methods Mol Biol* **103**, 107-20.
- Strayle, J., T. Pozzan and H. K. Rudolph (1999):** Steady-state free Ca²⁺ in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1. *Embo J* **18**, 4733-43.

- Streuli, C. H., B. Patel and D. R. Critchley (1981):** The Cholera-Toxin receptor ganglioside GM remains associated with triton X-100 cytoskeletons of BALB/c-3T3 cells. *Exp Cell Res* **136**, 247-54.
- Strochlic, T. I., T. G. Setty, A. Sitaram and C. G. Burd (2007):** Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol* **177**, 115-25.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986):** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff (1990):** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Sturley, S. L., Q. Elliot, J. LeVitre, D. J. Tipper and K. A. Bostian (1986):** Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 killer preprotoxin. *Embo J* **5**, 3381-9.
- Sudol, M. (1996):** Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol* **65**, 113-32.
- Sullivan, J. A., M. J. Lewis, E. Nikko and H. R. Pelham (2007):** Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase *rsp5* to membrane proteins *in vivo* and *in vitro*. *Mol Biol Cell* **18**, 2429-40.
- Sun, Y., S. Carroll, M. Kaksonen, J. Y. Toshima and D. G. Drubin (2007):** PtdIns(4,5)P₂ turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *J Cell Biol* **177**, 355-67.
- Sun, Y., M. Kaksonen, D. T. Madden, R. Schekman and D. G. Drubin (2005):** Interaction of Sla2p's ANTH domain with PtdIns(4,5)P₂ is important for actin-dependent endocytic internalization. *Mol Biol Cell* **16**, 717-30.
- Sun, Y., A. C. Martin and D. G. Drubin (2006):** Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev Cell* **11**, 33-46.
- Sung, M. K. and W. K. Huh (2007):** Bimolecular fluorescence complementation analysis system for *in vivo* detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**, 767-75.
- Suzuki, C. and S. Nikkuni (1994):** The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem* **269**, 3041-6.
- Swartz, J. R. and C. L. Cooney (1981):** Methanol Inhibition in Continuous Culture of *Hansenula polymorpha*. *Appl Environ Microbiol* **41**, 1206-13.
- Takei, K., V. I. Slepnev, V. Haucke and P. De Camilli (1999):** Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **1**, 33-9.
- Tamura, K., K. Yamada, T. Shimada and I. Hara-Nishimura (2004):** Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for degradation. *Plant J* **39**, 393-402.
- Tan, H. W. and S. T. Tay (2011):** Anti-*Candida* activity and biofilm inhibitory effects of secreted products of tropical environmental yeasts. *Trop Biomed* **28**, 175-80.
- Tan, P. K., J. P. Howard and G. S. Payne (1996):** The sequence NPF₂ defines a new class of endocytosis signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **135**, 1789-800.
- Tang, B. L., S. H. Wong, X. L. Qi, S. H. Low and W. Hong (1993):** Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J Cell Biol* **120**, 325-38.
- Tang, H. Y., J. Xu and M. Cai (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.
- Tang, J. B., P. Zhu, H. M. Yang, L. M. Sun, S. L. Song and A. G. Ji (2008):** Expression and secretion of recombinant ZZ-EGFP fusion protein by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* **30**, 1409-14.
- Tanguy-Rougeau, C., M. Wesolowski-Louvel and H. Fukuhara (1988):** The *Kluyveromyces lactis* KEX1 gene encodes a subtilisin-type serine proteinase. *FEBS Lett* **234**, 464-70.
- Tarr, P. I., C. A. Gordon and W. L. Chandler (2005):** Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**, 1073-86.
- Taylor, M. J., D. Perrais and C. J. Merrifield (2011):** A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* **9**, e1000604.
- Tekle, C., B. Deurs, K. Sandvig and T. G. Iversen (2008):** Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands. *Nano Lett* **8**, 1858-65.
- Terrell, J., S. Shih, R. Dunn and L. Hicke (1998):** A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* **1**, 193-202.
- Thorburn, A., J. Thorburn and A. E. Frankel (2004):** Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis* **9**, 19-25.
- Thorpe, G. H., L. J. Kricka, S. B. Moseley and T. P. Whitehead (1985):** Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* **31**, 1335-41.
- Thrasher, A. J. and S. Burns (2010):** WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* **10**, 182-92.
- Tikkanen, R., S. Obermuller, K. Denzer, R. Pungitore, H. J. Geuze, K. von Figura and S. Honing (2000):** The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic* **1**, 631-40.
- Tinker, J. K., J. L. Erbe and R. K. Holmes (2005):** Characterization of fluorescent chimeras of Cholera-Toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins produced by use of the twin arginine translocation system. *Infect Immun* **73**, 3627-35.
- Tipper, D. J. and M. J. Schmitt (1991):** Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol* **5**, 2331-8.
- Tirosh, B., M. H. Furman, D. Tortorella and H. L. Ploegh (2003):** Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J Biol Chem* **278**, 6664-72.
- Tolner, B., L. Smith, R. H. Begent and K. A. Chester (2006):** Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nat Protoc* **1**, 1006-21.

- Tolner, B., L. Smith, T. Hillyer, J. Bhatia, P. Beckett, L. Robson, S. K. Sharma, N. Griffin, *et al.* (2007): From laboratory to Phase I/II cancer trials with recombinant biotherapeutics. *Eur J Cancer* **43**, 2515-22.
- Toomre, D. and D. J. Manstein (2001): Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol* **11**, 298-303.
- Toret, C. P. and D. G. Drubin (2006): The budding yeast endocytic pathway. *J Cell Sci* **119**, 4585-7.
- Toret, C. P., L. Lee, M. Sekiya-Kawasaki and D. G. Drubin (2008): Multiple pathways regulate endocytic coat disassembly in *Saccharomyces cerevisiae* for optimal downstream trafficking. *Traffic* **9**, 848-59.
- Toshima, J., J. Y. Toshima, A. C. Martin and D. G. Drubin (2005): Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **7**, 246-54.
- Toshima, J. Y., J. Nakanishi, K. Mizuno, J. Toshima and D. G. Drubin (2009): Requirements for recruitment of a G protein-coupled receptor to clathrin-coated pits in budding yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 5039-50.
- Toshima, J. Y., J. Toshima, M. Kaksonen, A. C. Martin, D. S. King and D. G. Drubin (2006): Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5793-8.
- Townsley, F. M., G. Frigerio and H. R. Pelham (1994): Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J Cell Biol* **127**, 21-8.
- Traub, L. M. (2003): Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol* **163**, 203-8.
- Traub, L. M. (2005): Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 415-37.
- Traub, L. M. (2009): Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 583-96.
- Tsai, B., C. Rodighiero, W. I. Lencer and T. A. Rapoport (2001): Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold Cholera-Toxin. *Cell* **104**, 937-48.
- Tschopp, J. F., P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman and T. R. Gingeras (1987): Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res* **15**, 3859-76.
- Tsien, R. Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.
- Tuazon, P. T. and J. A. Traugh (1991): Casein kinase I and II—multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**, 123-64.
- Turgay, K., L. W. Hamoen, G. Venema and D. Dubnau (1997): Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **11**, 119-28.
- Umebayashi, K. and A. Nakano (2003): Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J Cell Biol* **161**, 1117-31.
- Vagnoli, P., R. A. Musmanno, S. Cresti, T. Di Maggio and G. Coratza (1993): Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the tuscany region of Italy. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4037-43.
- van den Berg, J. A., K. J. van der Laken, A. J. van Ooyen, T. C. Renniers, K. Rietveld, A. Schaap, A. J. Brake, R. J. Bishop, *et al.* (1990): *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (N Y)* **8**, 135-9.
- van der Schaar, H. M., M. J. Rust, C. Chen, H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X. Zhuang and J. M. Smit (2008): Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog* **4**, e1000244.
- van Deurs, B., P. K. Holm, L. Kayser and K. Sandvig (1995): Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line HEP-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes. *Eur J Cell Biol* **66**, 309-23.
- van Deurs, B., K. Sandvig, O. W. Petersen, S. Olsnes, K. Simons and G. Griffiths (1988): Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **106**, 253-67.
- van Deurs, B., T. I. Tonnessen, O. W. Petersen, K. Sandvig and S. Olsnes (1986): Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. *J Cell Biol* **102**, 37-47.
- van Ham, T. J., R. Breitling, M. A. Swertz and E. A. Nollen (2009): Neurodegenerative diseases: Lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO Mol Med* **1**, 360-370.
- van Ooyen, A. J., P. Dekker, M. Huang, M. M. Olsthoorn, D. I. Jacobs, P. A. Colussi and C. H. Taron (2006): Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **6**, 381-92.
- Velagapudi, V. R., C. Wittmann, K. Schneider and E. Heinzel (2007): Metabolic flux screening of *Saccharomyces cerevisiae* single knockout strains on glucose and galactose supports elucidation of gene function. *J Biotechnol* **132**, 395-404.
- Vida, T. A. and S. D. Emr (1995): A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-92.
- Viel, T., E. Dransart, F. Nemati, E. Henry, B. Theze, D. Decaudin, D. Lewandowski, R. Boisgard, *et al.* (2008): *In vivo* tumor targeting by the B-subunit of Shiga-Toxin. *Mol Imaging* **7**, 239-47.
- Vivero-Pol, L., N. George, H. Krumm, K. Johnsson and N. Johnsson (2005): Multicolor imaging of cell surface proteins. *J Am Chem Soc* **127**, 12770-1.
- Vogel, J. P., J. N. Lee, D. R. Kirsch, M. D. Rose and E. S. Sztul (1993): Brefeldin A causes a defect in secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**, 3040-3.
- Vogel, J. P., L. M. Misra and M. D. Rose (1990): Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol* **110**, 1885-95.
- von Figura, K. and A. Hasilik (1986): Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* **55**, 167-93.
- Walch, B. (2006): Heterologe Expression und Sekretion des viralen AB-Toxins K28 in der Milchsäuregärung *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.

- Walther, T. C., J. H. Brickner, P. S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja and P. Walter (2006): Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998-1003.
- Wang, P., B. Li, L. Zhou, E. Fei and G. Wang (2011): The KDEL receptor induces autophagy to promote the clearance of neurodegenerative disease-related proteins. *Neuroscience*.
- Wang, Y., Z. H. Liang, Y. S. Zhang, S. Y. Yao, Y. G. Xu, Y. H. Tang, S. Q. Zhu, D. F. Cui, et al. (2001): Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng* **73**, 74-9.
- Waring, M. J. (1965): Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **13**, 269-82.
- Warnier, M., W. Romer, J. Geelen, J. Lesieur, M. Amessou, L. van den Heuvel, L. Monnens and L. Johannes (2006): Trafficking of Shiga-Toxin/Shiga-like toxin-1 in human glomerular microvascular endothelial cells and human mesangial cells. *Kidney Int* **70**, 2085-91.
- Warren, D. T., P. D. Andrews, C. W. Gourlay and K. R. Ayscough (2002): Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J Cell Sci* **115**, 1703-15.
- Watson, H. A., M. J. Cope, A. C. Groen, D. G. Drubin and B. Wendland (2001): *In vivo* role for actin-regulating kinases in endocytosis and yeast epsin phosphorylation. *Mol Biol Cell* **12**, 3668-79.
- Watson, P., A. T. Jones and D. J. Stephens (2005): Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 43-61.
- Wegner, G. H. (1990): Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **7**, 279-83.
- Weiler, F. (2002): Molekularbiologische Charakterisierung des Antimykotikums Zygocin. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Weiler, F., K. Rehfeldt, F. Bautz and M. J. Schmitt (2002): The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Mol Microbiol* **46**, 1095-105.
- Weiler, F. and M. J. Schmitt (2003): Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res* **3**, 69-76.
- Wendland, B. and S. D. Emr (1998): Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J Cell Biol* **141**, 71-84.
- Wendland, B., S. D. Emr and H. Riezman (1998): Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 513-22.
- Wendland, B., J. M. McCaffery, Q. Xiao and S. D. Emr (1996): A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15. *J Cell Biol* **135**, 1485-500.
- Wendland, B., K. E. Steece and S. D. Emr (1999): Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *Embo J* **18**, 4383-93.
- Wesche, J., A. Rapak and S. Olsnes (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.
- Wesolowski-Louvel, M., C. Tanguy-Rougeau and H. Fukuhara (1988): A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **4**, 71-81.
- Wesolowski, J., R. Y. Hassan, S. Hodde, C. Bardroff and U. Bilitewski (2008): Sensing of oxygen in microtiter plates: a novel tool for screening drugs against pathogenic yeasts. *Anal Bioanal Chem* **391**, 1731-7.
- West, M., N. Zurek, A. Hoenger and G. K. Voeltz (2003): A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol* **193**, 333-46.
- Wetzel, R. (1994): Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol* **12**, 193-8.
- White, C. E., N. M. Kempf and E. A. Komives (1994): Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure* **2**, 1003-5.
- Whittaker, M. M. and J. W. Whittaker (2000): Expression of recombinant galactose oxidase by *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **20**, 105-11.
- Wickner, R. B. (1996): Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **30**, 109-39.
- Wiedenmann, J., F. Oswald and G. U. Nienhaus (2009): Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life* **61**, 1029-42.
- Wiest, D. L., A. Bhandoola, J. Punt, G. Kreibich, D. McKean and A. Singer (1997): Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1884-9.
- Wiest, D. L., W. H. Burgess, D. McKean, K. P. Kearse and A. Singer (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.
- Wilson, D. W., M. J. Lewis and H. R. Pelham (1993): pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *J Biol Chem* **268**, 7465-8.
- Winder, S. J., T. Jess and K. R. Ayscough (2003): SCP1 encodes an actin-bundling protein in yeast. *Biochem J* **375**, 287-95.
- Winter, D., A. V. Podtelejnikov, M. Mann and R. Li (1997): The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol* **7**, 519-29.
- Wong, B. Y., S. A. Gregory and N. H. Dang (2007): Denileukin diftitox as novel targeted therapy for lymphoid malignancies. *Cancer Invest* **25**, 495-501.
- Woo, J. H., Y. Y. Liu and D. M. Neville (2006): Minimization of aggregation of secreted bivalent anti-human T cell immunotoxin in *Pichia pastoris* bioreactor culture by optimizing culture conditions for protein secretion. *J Biotechnol* **121**, 75-85.
- Yamaizumi, M., E. Mekada, T. Uchida and Y. Okada (1978): One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**, 245-50.

- Yamamoto, K., R. Fujii, Y. Toyofuku, T. Saito, H. Koseki, V. W. Hsu and T. Aoe (2001):** The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *Embo J* 20, 3082-91.
- Yamamoto, T., H. C. Chen, E. Guigard, C. M. Kay and R. O. Ryan (2008):** Molecular studies of pH-dependent ligand interactions with the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 47, 11647-52.
- Yang, J., T. Moyana, S. MacKenzie, Q. Xia and J. Xiang (1998):** One hundred seventy-fold increase in excretion of an FV fragment-tumor necrosis factor alpha fusion protein (sFV/TNF-alpha) from *Escherichia coli* caused by the synergistic effects of Glyzine and triton X-100. *Appl Environ Microbiol* 64, 2869-74.
- Yang, J. S., S. Y. Lee, M. Gao, S. Bourgoïn, P. A. Randazzo, R. T. Premont and V. W. Hsu (2002):** ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *J Cell Biol* 159, 69-78.
- Yanushevich, Y. G., D. B. Staroverov, A. P. Savitsky, A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. E. Bulina, K. A. Lukyanov and S. A. Lukyanov (2002):** A strategy for the generation of non-aggregating mutants of *Anthozoa* fluorescent proteins. *FEBS Lett* 511, 11-4.
- Yarbrough, D., R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz and S. J. Remington (2001):** Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 462-7.
- Ye, Y., Y. Shibata, C. Yun, D. Ron and T. A. Rapoport (2004):** A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-7.
- Yeung, B. G., H. L. Phan and G. S. Payne (1999):** Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 3643-59.
- Yokomori, Y., H. Akiyama and K. Shimizu (1988):** Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric Biol Chem* 52, 2791-2796.
- Young, A. (2007):** Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* 18, 448-58.
- Yu, M. and D. B. Haslam (2005):** Shiga-Toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun* 73, 2524-32.
- Zeng, G., X. Yu and M. Cai (2001):** Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol Biol Cell* 12, 3759-72.
- Zhang, B., A. Chang, T. B. Kjeldsen and P. Arvan (2001):** Intracellular retention of newly synthesized insulin in yeast is caused by endoproteolytic processing in the Golgi complex. *J Cell Biol* 153, 1187-98.
- Zhang, F., M. W. Skoda, R. M. Jacobs, S. Zorn, R. A. Martin, C. M. Martin, G. F. Clark, S. Weggler, et al. (2008):** Reentrant condensation of proteins in solution induced by multivalent counterions. *Phys Rev Lett* 101, 148101.
- Zhang, W., M. A. Bevins, B. A. Plantz, L. A. Smith and M. M. Meagher (2000):** Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Bioeng* 70, 1-8.
- Zhao, C., L. M. Hellman, X. Zhan, W. S. Bowman, S. W. Whiteheart and M. G. Fried (2010):** Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. *Anal Biochem* 399, 237-45.
- Zhou, X. S., W. M. Fan and Y. X. Zhang (2002):** Effects of different methanol feeding strategy on hirudin production in high-density fermentation by recombinant *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 18, 348-51.
- Zhu, H. and H. Bussey (1989):** The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol* 55, 2105-2107.
- Zhu, H. and H. Bussey (1991):** Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol* 11, 175-81.
- Zhu, Y. S., J. Kane, X. Y. Zhang, M. Zhang and D. J. Tipper (1993):** Role of the gamma component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. *Yeast* 9, 251-66.
- Zimmermann, R., S. Eyrisch, M. Ahmad and V. Helms (2011):** Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808, 912-24.
- Zlotnik, H., M. P. Fernandez, B. Bowers and E. Cabib (1984):** *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol* 159, 1018-26.
- Zornetta, I., L. Brandi, B. Janowiak, F. Dal Molin, F. Tonello, R. J. Collier and C. Montecucco (2010):** Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras. *Cell Microbiol* 12, 1435-45.

Veröffentlichung

Carroll, S. Y., P. C. Stirling, H. E. Stimpson, E. Giesselmann, M. J. Schmitt and D. G. Drubin (2009): A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev Cell* 17, 552-60.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Überlassung des interessanten, vielfältigen und herausfordernden Themas. Sein stetes Interesse am Fortschritt meiner Experimente, seine zahlreiche Anregungen und aufmunternden Worte haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Herzlichen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die Chance an der Weiterbildung durch das Graduiertenkolleg teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. J. Rettig danke ich für die Übernahme des Koreferates, die freundliche und hilfsbereite Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs sowie für die Möglichkeit, die TIRF-basierte Mobilitätsanalyse und die „Structured Illumination“ Mikroskopie durchzuführen. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Dr. Ute Becherer und ihrem Team, die mir mit viel Geduld und konstruktiven Ideen nicht nur bei der Mikroskopie, sondern auch dem anschließenden Tracking und der statistischen Auswertung geholfen haben.

Für die freundliche und schnelle Bereitstellung von Hefestämmen oder Plasmiden danke ich Prof. Dr. G. Payne, Prof. Dr. S. Michaelis, Prof. Dr. L. Robinson, Prof. Dr. L. Conibear, Prof. Dr. P. Lipp und Prof. Dr. J. Rettig. Bei Leon Muijs bedanke ich mich für seine nette Unterstützung am konfokalen Laserscanning Mikroskop sowie seine Anregungen und Ratschläge zur Optimierung. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Heinzle danke ich dafür, dass ich das Oxoplate-System testen und den Fluoreszenz-Reader nutzen durfte. Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Giffhorn bedanke ich mich für die Möglichkeit, das Äkta-System zu verwenden und für ihre kompetente Hilfe bei proteinbiochemischen Fragen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle und fachliche Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs (GRK 845). Dr. Gabriele Amoroso danke ich besonders für die freundliche Unterstützung und die perfekte Organisation von Symposien und Kolloquien. Bei den Kollegiaten bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre und die interessanten Diskussionen.

Bei Dr. Frank Breinig bedanke ich mich für die guten Ratschläge und Ideen zur Lösung theoretischer und praktischer Probleme sowie das Korrekturlesen der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt der Erd2p-Expertin Dr. Julia Dausend für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Hilfe bei der konfokalen Laserscanning Mikroskopie und die freundliche Aufnahme in das „Schreibräumchen“.

Der weltbesten Labormannschaft danke ich für eine unvergessliche Zeit: Dr. Björn Diehl für seine Hilfe in allen Lebenslagen, vor allem bei der Lösung jeglicher Computer-Probleme. Nina Müller, meiner Mitstreiterin im GRK, für die unterhaltsamen Mittagspausen und den Beistand in nervenaufreibenden Phasen. Thorsten Hoffmann für das geduldige Zuhören und das Aufzeigen neuer Blickwinkel. Björn Becker für konstruktive Diskussionen und viele lustige Momente. Herzlichen Dank Euch allen!

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft. Nicole danke ich für ihre schnelle und kompetente Hilfe bei bürokratischen Fragen und die netten Gespräche. Ein besonderer Dank geht an Roswitha für ihre Unterstützung im Laboralltag, ihren unersetzlichen Einsatz bei der Durchführung von Experimenten und natürlich für die Weihnachtsbäckerei. Herzlichen Dank an Herrn Witte für seine große Hilfe bei der chromatographischen Proteinreinigung und Fermentation, seine vielen Ideen und Ratschläge sowie seine Geduld, Techniken zu erklären und neue Fragestellungen zu bearbeiten. Weiterhin danke ich Andrea und Sabine für ihre engagierte Hilfe, unter anderem bei den Zellfraktionierungen und für die Bereitstellung von Toxinkonzentrat.

Ein großes Dankeschön geht an meine ehemaligen Studenten Sebastian Klein, Sam Ringle, Julien Gasser, Ruth Kiefer, Victor Schubnel und Lilli Gerstenmaier, die während ihres F-Praktikums, ihrer Diplom- oder Bachelor-Arbeit oder als Hiwi mit großem Interesse und hoher Einsatzbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein innigster Dank gilt meiner Familie, die mir Rückhalt gegeben und mich in jeder Hinsicht bedingungslos unterstützt hat. Meinem Vater Markus danke ich für sein wissenschaftliches Interesse am Fortgang meiner Arbeit, meiner Mutter Claudia für ihren unerschütterlichen Optimismus und meinem Bruder Gideon für seinen besonderen Humor. Bei meinem Lebensgefährten Johannes bedanke ich mich von ganzem Herzen für die Geduld, das Verständnis, Aufrichten, Zuhören und die optimale Unterstützung.