

# Die Rolle von Sec63p in der ER-assozierten Degradation von *S. cerevisiae*

## Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin  
Christina Servas

Saarbrücken 2013

Tag des Kolloquiums: 20.03.2014

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Prüfungsausschuss

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Römisch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Zimmermann

Vorsitzender: Prof. Dr. Volkhard Helms

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Frank Hannemann

*Meiner Familie gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Proteintranslokation ins Hefe ER und die Funktion von Sec63p . . . . .	1
1.2 Endoplasmatisches-Retikulum-assoziierte-Degradation (ERAD) . . . . .	6
1.3 DnaJ-Domänen-Proteine . . . . .	12
1.4 „Unfolded Protein Response“ (UPR) . . . . .	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	17
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1 Materialien und Chemikalien . . . . .	18
2.2 Organismen . . . . .	22
2.3 Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper . . . . .	24
2.4 Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .	27
2.5 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	27
2.6 Langzeitlagerung von Bakterien und Hefen . . . . .	29
2.7 Zellzahlbestimmung . . . . .	29
2.7.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl . . . . .	29
2.7.2 Bestimmung der optischen Dichte . . . . .	29
2.8 Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	29
2.8.2 Plasmid-Reisolation aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	30
2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	31
2.8.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA . . . . .	31
2.8.5 Deletion von Genen der chromosomalen DNA in Hefen . . . . .	31
2.8.6 Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	32
2.8.7 Error-prone-PCR . . . . .	33
2.8.8 Hefe-Transformation mit Elektroporation . . . . .	33
2.8.9 Hefe-Transformation mit Lithiumacetat . . . . .	34

2.8.10	Plasmid-shuffle mittels FOA-Selektion . . . . .	35
2.8.11	Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	36
2.8.12	Bakterien-Transformation . . . . .	36
2.8.13	TOPO-Klonierung . . . . .	37
2.8.14	Plasmid-Präparation . . . . .	37
2.8.15	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen . . . . .	38
2.8.16	DNA-Ligation . . . . .	38
2.8.17	DNA-Sequenzierung . . . . .	38
2.8.18	Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS) . . . . .	38
2.8.19	<i>sec63</i> -Mutanten-Screen . . . . .	39
2.9	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	43
2.9.1	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	43
2.9.2	SDS-PAGE . . . . .	43
2.9.3	Western Blot . . . . .	44
2.9.4	Immundetektion . . . . .	45
2.9.5	Coomassie-Färbung . . . . .	46
2.9.6	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay . . . . .	46
2.9.7	Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (His-Trap) . . . . .	47
2.9.8	Aufreinigung von CPY . . . . .	47
2.9.9	Aufreinigung des pp $\alpha$ -Faktors . . . . .	48
2.9.10	Pulse-Chase und Immunpräzipitation . . . . .	49
2.9.11	Cycloheximid-Chase . . . . .	52
2.10	Hefe-spezifische Methoden . . . . .	53
2.10.1	Wachstumstest auf festem Nährmedium . . . . .	53
2.10.2	<i>In vivo</i> Protein-Import-Assay . . . . .	53
2.10.3	Kreuzung zweier haploider Stämme . . . . .	54
2.10.4	Sporulation und Dissektion eines diploiden Stammes . . . . .	55
2.10.5	Colony Blot . . . . .	56
2.10.6	UPRE-lacZ-Assay . . . . .	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
3.1	Etablierung des <i>sec63</i> -Mutanten-Screens . . . . .	59
3.1.1	Deletion von <i>SEC63</i> . . . . .	59
3.1.2	Proteinaufreinigung von CPY zur Antikörperherstellung . . . . .	62
3.1.3	Proteinaufreinigung des pp $\alpha$ F zur Antikörperherstellung . . . . .	63
3.1.4	Deletion von <i>DER1</i> in W303-1C . . . . .	64
3.1.5	Identifizierung von neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	65
3.2	Charakterisierung der neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	67
3.2.1	Wachstum und Protein-Import der <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	67
3.2.2	Co- und posttranslatonaler Import . . . . .	72
3.3	Untersuchung der <i>sec63</i> -Mutanten auf UPR-Aktivität . . . . .	75
3.3.1	Kreuzung der <i>sec63</i> -Mutanten mit einem $\Delta$ <i>ire1</i> -Stamm . . . . .	75
3.3.2	UPR-Aktivität von <i>sec63-402</i> und <i>sec63-404</i> . . . . .	77

3.4	ERAD in den neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	79
3.4.1	ERAD von CPY* . . . . .	80
3.4.2	ERAD des Transmembranproteins Deg1::Sec62 <sup>ProtA</sup> . . . . .	92
3.4.3	Degradation des löslichen ERAD-Substrats KHN . . . . .	98
3.4.4	ERAD von Sec61-2p in <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	102
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>
4.1	Temperatur- und Stresssensitivität der neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	105
4.2	Charakterisierung des co- und posttranslationalen Protein-Imports ins ER in den <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	106
4.3	Erhöhte UPR-Aktivität in <i>sec63-402</i> . . . . .	107
4.4	ERAD löslicher und transmembraner Substrate in <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	109
4.5	Strukturelle Effekte der Mutationen in der DnaJ-Domäne von <i>sec63-401</i> und <i>sec63-402</i> . . . . .	113
4.6	Auswirkungen von Depletion und Überexpression von Sec63p auf die Degradation von ERAD-Substraten . . . . .	116
4.7	Kontext zu <i>SEC63</i> -bezogenen Krankheitsbildern . . . . .	117
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>119</b>
	Poster . . . . .	119
	Publikation . . . . .	119
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>137</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Sec63-Komplexes . . . . .	3
1.2	Schematische Darstellung der ER-assoziierten Degradation . . . . .	6
1.3	Schematische Darstellung der Reaktionskaskade zur Detektion, Ubiquitinierung und Degradation eines Proteasomensubstrates . . . . .	7
1.4	Struktureller Aufbau des 26S-Proteasoms . . . . .	9
1.5	Schematische Darstellung des Ire1p-Signalweges . . . . .	15
2.1	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des <i>sec63</i> -Mutanten-Screens (Teil 1) . . . . .	41
2.2	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des <i>sec63</i> -Mutanten-Screens (Teil 2) . . . . .	42
2.3	Schematische Darstellung des <i>in vivo</i> Protein-Import-Assays . . . . .	54
2.4	Eine Tetrade aus der Kreuzung der Stämme KRY875 und dem $\Delta$ <i>ire1</i> -Stamm KRY160 . . . . .	55
3.1	Identifikation des $\Delta$ <i>sec63</i> -Stammes mit <i>SEC63-URA3-pRS316</i> . . . . .	61
3.2	Aufreinigung des CPY-Fragments mit His-Tag . . . . .	62
3.3	Aufreinigung des pp $\alpha$ F . . . . .	63
3.4	CPY*-Degradation in W303-1C und $\Delta$ <i>der1</i> -W303-1C . . . . .	64
3.5	Schematische Darstellung der Punktmutationen in den neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	66
3.6	CPY*-Akkumulation in den neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	67
3.7	Wachstumstest der neuen <i>sec63</i> -Mutanten auf festem Medium . . . . .	68
3.8	Vereinzelte <i>sec63-406</i> -Domänen auf FOA-Medium . . . . .	69
3.9	Wachstumstest auf festem Medium mit <i>sec63-404</i> und <i>sec63-406</i> mit vereinzelter Brl- und saurer Domäne . . . . .	70
3.10	Wachstumstest auf festem Medium von <i>sec63-405</i> und den Stämmen mit vereinzelter Domäne . . . . .	71
3.11	<i>In vivo</i> Protein-Import-Assay der neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	72
3.12	<i>In vivo</i> Protein-Import-Assay mit <i>sec63</i> -Mutanten mit vereinzelter Domäne . . . . .	74
3.13	Kreuzung der <i>sec63</i> -Mutanten mit einem $\Delta$ <i>ire1</i> -Stamm . . . . .	76
3.14	UPR-Reporter-Assay mit <i>sec63-402</i> und <i>sec63-404</i> . . . . .	78
3.15	Schematische Darstellung der ERAD-Substrate . . . . .	80
3.16	ERAD von CPY* in den neuen <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	81
3.17	ERAD von CPY*-HA in <i>sec63-201</i> . . . . .	83
3.18	ERAD von CPY* in <i>sec63-405</i> mit vereinzelter Domäne . . . . .	84
3.19	ERAD von CPY* in vereinzelter Domäne von <i>sec63-406</i> bei 30 °C und 35 °C . . . . .	86
3.20	ERAD von CPY* bei 23 °C und 37 °C in <i>sec63-402</i> . . . . .	88

3.21	ERAD von CPY* bei 1 min Labeling-Zeit in <i>sec63-402</i> . . . . .	89
3.22	ERAD von CPY* mit überexprimiertem Sec63p . . . . .	90
3.23	ERAD von CPY* mit depletiertem Sec63p . . . . .	92
3.24	Schematische Darstellung von Deg1::Sec62 <sup>ProtA</sup> . . . . .	93
3.25	Test der Galaktose-Induktionszeit von Deg1::Sec62 <sup>ProtA</sup> . . . . .	94
3.26	ERAD von Deg1::Sec62 <sup>ProtA</sup> in <i>sec63-201</i> . . . . .	95
3.27	ERAD von Deg1::Sec62 <sup>ProtA</sup> in <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	96
3.28	ERAD von Deg1::Sec62 <sup>ProtA</sup> bei überexprimiertem Sec63p . . . . .	98
3.29	ERAD von KHN und KWW in <i>sec63-201</i> . . . . .	100
3.30	KHN-Degradation in <i>sec63-402</i> . . . . .	101
3.31	ERAD von Sec61-2p in <i>sec63</i> -Mutanten . . . . .	102
4.1	Schematische Darstellung der Degradation von löslichen und transmembranen ERAD-Substraten . . . . .	113
4.2	Sequenzvergleich der DnaJ-Domänen verschiedener Hefe-Proteine . . . . .	115

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte mit Herstellerangaben . . . . .	18
2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben . . . . .	20
2.3	Verwendete Kits mit Herstellerangaben . . . . .	20
2.4	Verwendete Chemikalien und Enzyme mit Herstellerangaben . . . . .	21
2.5	Verwendete Hefestämme mit Genotyp und Quelle . . . . .	22
2.6	Verwendete Bakterienstämme mit Genotyp und Quelle . . . . .	23
2.7	Verwendete Plasmide mit Verwendungszweck und Bezugsquelle bzw. Referenz	24
2.8	Verwendete Oligonukleotide . . . . .	25
2.9	Verwendete Antikörper . . . . .	26
3.1	Übersicht über die Kreuzungen der <i>sec63</i> -Mutanten mit dem $\Delta ire1$ -Stamm .	75
3.2	Überblick über die Charakteristika der ERAD-Substrate . . . . .	79

# Abkürzungsverzeichnis

<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ammoniumsulfat
<b>ADPKD</b>	Autosomal dominante polycystische Nierenkrankheit
<b>ADPLD</b>	Autosomal dominante polycystische Leberkrankheit
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>βGII</b>	β-Untereinheit der Glukosidase II
<b>C-Terminus</b>	Carboxyterminus
<b>CaAc</b>	Calciumacetat
<b>CPY/CPY*</b>	Carboxypeptidase Y/mutierte Form der Carboxypeptidase Y
<b>d/o</b>	„drop out“
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleotide
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	„ <i>Escherichia coli</i> “
<b>ECL</b>	„enhanced chemiluminescence“
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ERAD</b>	„endoplasmic reticulum associated degradation“

<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>g</b>	Gramm; Ortsfaktor
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>KAc</b>	Kaliumacetat
<b>kb</b>	Kilobase
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	„lysogeny broth“
<b>LiAc</b>	Lithiumacetat
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>N-Terminus</b>	Aminoterminus
<b>NaAc</b>	Natriumacetat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORF</b>	„open reading frame“
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>POX</b>	Meerrettich-Peroxidase
<b>ppαF</b>	prä-pro-alpha-Faktor
<b>PRKCSH</b>	Protein Kinase C Substrat 80 K-H
<b>rpm</b>	„revolutions per minute“
<b>RT</b>	Raumtemperatur

<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SRP</b>	„signal recognition particle“
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Zeit, nach der die Hälfte des ERAD-Substrats degradiert ist
<b><i>Taq</i></b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBS(T)</b>	Tris-bufferedsaline (+ 0,1% Tween)
<b>TEMED</b>	N,N,N,N-Tetramethylethan-1,2-diamin
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>u</b>	Unit
<b>v/v</b>	„volume per volume“
<b>w/v</b>	„weight per volume“
<b>WB</b>	Western Blot
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>YNB</b>	„yeast nitrogen base“
<b>YPD</b>	„yeast extract peptone dextrose“

# Abstract

Misfolded secretory proteins are translocated from the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) to the cytoplasm for degradation by the ubiquitin-proteasome system (ER-associated degradation, ERAD). How exactly this export from the ER is accomplished is still not understood. Several studies using a single leaky *sec63* mutant suggested that Sec63p might be involved in protein export. To examine this issue further, I used a screen in which random point mutations were inserted into the *SEC63* gene. I tested the mutants for accumulation of the ERAD substrate CPY\*. Accumulation of CPY\* in cells indicates a degradation defect. I isolated six *sec63* mutants of which only *sec63-402* showed a strong accumulation of CPY\*. This mutant carries a mutation in the interaction area with the chaperone Kar2p, the so called J-domain. Mutants with point mutations in the transmembrane, the Brl or the acidic domain caused no detectable ERAD defect for CPY\*. The examination of other ERAD substrates showed that *sec63-402* affected only degradation of soluble substrates. This demonstrates that in yeast the interaction of Sec63p with Kar2p is important for the specific degradation of soluble ERAD substrates.

Fehlgefaltete sekretorische Proteine werden aus dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das Cytoplasma transloziert, wo sie von dem Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden (ER-assoziierte Degradation, ERAD). Wie genau die Proteine aus dem ER transportiert werden, ist noch nicht geklärt. Verschiedene Studien, die eine einzige „leaky“ *sec63*-Mutante verwendeten, lassen vermuten, dass Sec63p beim Proteinexport beteiligt sein könnte. Um diesen Sachverhalt genauer zu erforschen, habe ich einen Screen verwendet, bei dem willkürliche Punktmutationen in das *SEC63*-Gen eingefügt wurden. Ich habe die Mutanten auf Akkumulation des ERAD-Substrats CPY\* getestet, welche auf einen Defekt bei dessen Degradation hindeuten. Ich habe sechs Mutanten isoliert, wovon nur *sec63-402* eine deutliche Akkumulation von CPY\* aufwies. Diese Mutante trägt eine Mutation in dem Interaktionsbereich mit dem Chaperon Kar2p, der sogenannten J-Domäne. Mutanten mit Punktmutationen in der Transmembran-, Brl- oder sauren Domäne wiesen keine Degradationsdefekte auf. Durch Untersuchung von anderen ERAD-Substraten zeigte sich, dass sich der Degradationsdefekt in *sec63*-mutierten Hefezellen auf lösliche Proteine beschränkt. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sec63p durch seine Interaktion mit Kar2p an der Degradation von löslichen ERAD-Substraten beteiligt ist.

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteintranslokation ins Hefe ER und die Funktion von Sec63p

Von den neu-synthetisierten Proteinen einer Zelle werden 30% dem sekretorischen Weg zugeführt (Ghaemmaghami et al., 2003). Dabei passieren diese Proteine in der eukaryontischen Zelle verschiedene Kompartimente, die Organellen, innerhalb der Zelle, die durch Membranen von dem Cytosol abgegrenzt sind (Palade, 1975). Die erste Station der sekretorischen Proteine stellt ein stark verzweigtes Membrannetzwerk, das endoplasmatische Retikulum (ER) dar (Zimmermann et al., 2011). Dort werden sie in der Hefe verschiedenen posttranslationalen Modifikationen unterzogen, wie N- und O-Glykosylierung und Bildung von Proteindisulfidbrücken, aber auch die Faltung der Proteine wird koordiniert (Gentzsch et al., 1995; Kelleher & Gilmore, 2006; Oka & Bulleid, 2013). Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, dass die korrekte Faltung streng überwacht wird, damit keine fehlerhaften und damit oft toxischen Proteine in den Organismus gelangen und ihn dadurch potentiell schädigen (Meusser et al., 2005).

Die Proteine werden durch eine wässrige Pore, den Sec61-Komplex, der aus Sec61p, Sss1p und Sbh1p besteht, in das Lumen des ER importiert (Osborne et al., 2005). Bei dem posttranslationalen Protein-Import ist der Sec61-Komplex mit dem Sec63-Komplex assoziiert (Panzner et al., 1995). Sec61p bildet dabei mit seinen 10 Transmembrandomänen den Transportkanal (Wilkinson et al., 2000). Sss1p und Sbh1p durchspannen die Membran nur einmal (Wilkinson et al., 2000). Sss1p ist an der Peripherie des Sec61p angelagert und fixiert die beiden Hälften des Proteins, wodurch es maßgeblich zur Stabilisierung des Kanals beiträgt (Esnault et al., 1994). Sbh1p ist im Gegensatz zu Sec61p und Sss1p nicht essentiell für die Proteintranslokation und die Lebensfähigkeit der Hefen (Rapoport, 2007).

Neben dem Sec61-Komplex gibt es noch einen zweiten Importkomplex, den Ssh1-Komplex („sec sixty-one homolog“), der aus dem Sec61p-Homolog, Ssh1p, dem Sbh1p-Homolog, Sbh2p, und Sss1p aufgebaut ist (Finke et al., 1996). Beide Komplexe sind mit Ribosomen assoziiert, der Ssh1-Komplex interagiert jedoch nicht mit dem Sec63-Komplex (Finke et al.,

1996). Desweiteren konnte eine Interaktion des Ssh1-Komplexes mit Signalsequenzen von Peptiden festgestellt werden, die cotranslational transportiert werden können (Invertase und Kar2p), nicht hingegen mit Signalsequenzen von posttranslational importierten Proteinen (Carboxypeptidase Y: CPY; prä-pro-alpha-Faktor: pp $\alpha$ F) (Wittke et al., 2002). Der Sec61-Komplex, der Proteine beider Importwege transloziert, scheint Proteine mit einem breiteren Spektrum an Signalsequenzen zu akzeptieren als der Ssh1-Komplex, der eher Proteine mit stark hydrophoben Signalsequenzen transportiert, die charakteristisch sind für cotranslational importierte Proteine (Wittke et al., 2002).

Der Import der sekretorischen Proteine in das ER kann auf post- oder cotranslationalem Weg erfolgen (Schnell & Hebert, 2003). Die wesentlichen Unterschiede bestehen darin, dass die Translation bei dem posttranslationalen Weg komplett abgeschlossen ist und das Protein vom Ribosom dissoziiert vorliegt, wobei es von Chaperonen transportkompetent gehalten wird (Chirico et al., 1988). Bei dem cotranslationalen Weg hingegen, wird die Translation noch fortgeführt und das Ribosom ist an der Peptidkette assoziiert (Schnell & Hebert, 2003). Welcher Weg eingeschlagen wird, ist abhängig von der Signalsequenz, die, wie oben bereits erwähnt, beim cotranslationalen Import eine deutlich stärkere Hydrophobizität aufweist als bei posttranslational importierten Proteinen (Ng et al., 1996; Blobel & Dobberstein, 1975). Die Signalsequenz variiert in ihrer Länge zwischen 15-50 Aminosäuren und lässt sich in drei Bereiche gliedern (von Heijne, 1985):

- eine positiv-geladene N-terminale Region
- eine zentrale Region, die entsprechend ihrem Importweg im Maße ihrer Hydrophobizität variiert
- eine eher polar geladene C-terminale Region, die auch die Signalpeptidaseschnittstelle enthält

Die Erkennung der Signalsequenz verläuft auf beiden Wegen unterschiedlich. Beim cotranslationalen Import-Weg ist sie von dem Signalerkennungspartikel („signal recognition particle“; SRP) abhängig, der in Mammalia und Hefe aus sechs Proteinuntereinheiten und einer RNA aufgebaut ist, wobei einige Proteine und auch die RNA sich in ihrer Größe in beiden Spezies unterscheiden (Pool, 2005). Das SRP bindet an die Polypeptidkette in einer GTP-abhängigen Weise, was zur Verlangsamung der Elongation führt (Siegel & Walter, 1988; Keenan et al., 2001). Dies gibt dem Komplex aus Ribosom, naszierendem Protein und SRP Zeit, sich an den Translokationskanal anzulagern (Pool, 2005). Dabei wird das SRP an den

heterodimeren SRP-Rezeptor gebunden, der mit dem Translokation assoziiert ist (Pool, 2005). Diese Bindung ermöglicht die Loslösung der naszierenden Kette vom SRP und die Interaktion des Ribosoms mit dem Translokationskanal (Pool, 2005). Durch die Hydrolyse des GTP dissoziiert SRP vom Ribosom und ist anschließend für eine Bindung an eine neue Signalsequenz bereit (Pool, 2005). Die Translation des Proteins wird nach Bindung an den Translokationskanal wieder aufgenommen und das Protein oder Polypeptid gelangt anschließend ins Innere des ER (Pool, 2005).

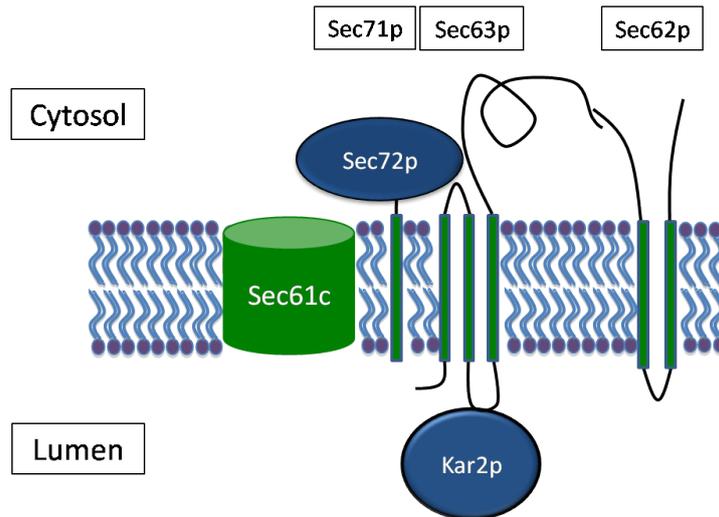


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Sec63-Komplexes

In dieser Abbildung wird der Sec63-Komplex dargestellt mit seinen transmembranen Komponenten Sec63p, Sec62p und Sec71p und dem an Sec71p-gebundenen, löslichen Sec72p. Außerdem sind die Bindungspartner Kar2p und der Sec61-Komplex (Sec61c) gezeigt, wie auch die Interaktion von Kar2p und Sec62p mit Sec63p.

Beim posttranslationalen Import ist die Erkennung der Signalsequenz abhängig von dem Transmembranprotein Sec62p (Deshaies & Schekman, 1990). Sec62p (30 kDa) besteht aus zwei Transmembrandomänen mit langen cytosolischen C- und N-terminalen Bereichen (Deshaies & Schekman, 1990). Es bildet zusammen mit Sec71p, Sec72p und Sec63p den Sec63-Komplex (siehe Abb. 1.1 und Brodsky & Schekman, 1993), der während des posttranslationalen Imports an den Sec61-Komplex angelagert ist (Deshaies et al., 1991). Der Sec63-Komplex ist beim posttranslationalen Import involviert und trägt zusätzlich zur Stabilisierung des Translokons bei (Jermy et al., 2006). Die Interaktionsstelle für die Signalsequenz wird von Sec62p und Sec71p zusammen mit Sec61p gebildet (Wittke et al., 2000; Plath et al., 1998, 2004). Die Übertragung des Polypeptids vom Sec62p-beinhaltenden Komplex auf den Sec61-Komplex geschieht in einer ATP-abhängigen Weise, was aufgrund von

„crosslinking“-Experimenten geschlossen werden konnte (Müsch et al., 1992). Dabei konnten nur „Crosslinks“ zwischen dem Polypeptid und Sec61p bei Zugabe von ATP nachgewiesen werden (Müsch et al., 1992). Wenn dem Versuch kein ATP zugesetzt wurde, konnte hauptsächlich eine Interaktion zwischen dem Polypeptid und Sec62p festgestellt werden (Müsch et al., 1992).

Das Transmembranprotein Sec71p (auch als Sec66p bezeichnet) und das daran angelagerte lösliche Sec72p sind im Gegensatz zu Sec62p und Sec63p nicht essentiell (Feldheim et al., 1993; Feldheim & Schekman, 1994; Feldheim et al., 1992; Deshaies & Schekman, 1990). Jedoch ist bei einer Deletion von Sec71p und Sec72p die Akkumulation von manchen nicht-importierten Proteinen im Cytosol zu beobachten (Feldheim et al., 1993; Feldheim & Schekman, 1994; Green et al., 1992). Bei Sec71p handelt es sich um ein 31,5 kDa integrales Protein, dessen N-Terminus in das ER-Lumen gerichtet ist und zweimal glykosyliert wird (Feldheim et al., 1993). Deletion des *SEC71*-Gens stört die Bildung des Sec63-Komplexes und auch die Anlagerung von Sec72p (21,5 kDa) (Feldheim et al., 1993).

Bei Sec63p (75 kDa) handelt es sich um ein Protein mit drei Transmembrandomänen, das in die Membran des ER eingelagert ist und einen langen C-terminalen cytoplasmatischen Schwanz hat (Rothblatt et al., 1989; Feldheim et al., 1992). Dieser C-terminale Teil des Proteins lässt sich in die Brl-Domäne und in eine saure Domäne aufteilen (Feldheim et al., 1992). Die Brl-Domäne ist homolog zum Brr2p Protein, welches Teil der U5-Familie der RNA-Helikasen ist (Ponting, 2000). Sie erstreckt sich über 371 Aminosäuren und dient zur Vermittlung der Interaktion mit dem Sec61-Komplex (Jermy et al., 2006; Harada et al., 2011). Die C-terminalen 52 Aminosäuren weisen einen stark sauren Charakter auf, was dieser Domäne ihren Namen verleiht (Feldheim et al., 1992). Sie dient zur Interaktion mit Sec62p, das über seinen N-Terminus im Wesentlichen mit den letzten 14 Aminosäuren der sauren Domäne von Sec63p interagiert (Wittke et al., 2000; Willer et al., 2003).

Zwischen der zweiten und der dritten Transmembrandomäne von Sec63p befindet sich ein luminaler Bereich mit der DnaJ-Domäne (Feldheim et al., 1992). Diese Namensgebung erfolgte wegen seiner Homologie zum *Escherichia coli* (*E. coli*) Protein DnaJ (Georgopoulos et al., 1980). Über die DnaJ-Domäne wird die Interaktion mit dem Hsp70-Chaperon Kar2p (BiP in Mammalia) vermittelt (Brodsky & Schekman, 1993; Corsi & Schekman, 1997). Dabei stimuliert Sec63p die ATPase-Aktivität von Kar2p, was dessen Peptidbindungs-fähigkeit beeinflusst (Corsi & Schekman, 1997). Eine Hypothese besteht darin, dass Kar2p bei dem Proteinimport wie eine Ratsche funktioniert und progressiv mehrere Kar2p-Moleküle an das translozierende Protein binden, wenn es durch Brown'sche Molekularbewegung weiter in das ER-Lumen eintritt (Matlack et al., 1999; Sanders et al., 1992). So kann sich das translo-

zierende Protein nicht mehr in die Richtung des Cytoplasmas bewegen und wird dadurch schließlich komplett in das ER-Lumen transportiert.

Neben dem posttranslationalen Import spielt Sec63p auch bei dem cotranslationalen Weg eine Rolle, wie am Beispiel der Invertase in der Publikation von Brodsky gezeigt wurde (Brodsky et al., 1995). Darin wird dargestellt, dass Sec63p beim Import sowohl des ausschließlich cotranslational importierten Substrats Invertase, als auch des posttranslational translozierenden  $\text{pp}\alpha\text{F}$  beteiligt ist (Brodsky et al., 1995). Die Aufgaben der einzelnen Domänen von Sec63p sind bei den beiden Importwegen unterschiedlich, zum Beispiel wurde gezeigt, dass die saure Domäne nur für den posttranslationalen Import wichtig ist, wohingegen Deletionen in der Brl-Domäne einen Defekt sowohl im co- als auch im posttranslationalen Weg nach sich ziehen (Willer et al., 2003; Jermy et al., 2006). Jermy et al., 2006 konnten zeigen, dass bei der Deletion des Bereiches von 550 bis 611 Aminosäuren beide Wege des Imports in das ER nicht mehr möglich sind, und dass die Brl-Domäne von Sec63p wichtig ist für die Integrität des SEC-Komplexes (Jermy et al., 2006). Außer dem zuvor genannten heteroheptameren Komplex zusammen mit dem Sec61-Komplex gibt es noch einen SEC'-Komplex (Jermy et al., 2006). Dieser unterscheidet sich nur durch das Fehlen von Sec62p (Jermy et al., 2006). Die SEC'-Form scheint für den cotranslationalen Import notwendig zu sein (Jermy et al., 2006). Neben der Interaktion von Sec63p mit dem Sec61-Komplex konnte auch eine funktionale Interaktion von Sec63p mit dem Ssh1-Komplex während des Imports von Sec71p nachgewiesen werden (Spiller & Stirling, 2011).

Es gibt Hinweise, dass Sec63p auch eine Rolle bei der Retrotranslokation von fehlgefalteten oder mutierten Proteinen aus dem ER ins Cytosol während des ERAD spielt (Pilon et al., 1997). Dies wurde mittels der ERAD-Substrate CPY\* und  $\Delta\text{gp}\alpha$ -Faktor untersucht (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997). Zur Untersuchung dieser Degradationsdefekte wurde die damals einzige vorhandene Mutante, *sec63-1*, verwendet (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997). Diese Mutante trägt eine Punktmutation in der DnaJ-Domäne (A179T) und ist „leaky“, es ist also nicht sicher, ob die beobachteten Degradationsdefekte von CPY\* und  $\Delta\text{gp}\alpha\text{F}$  auf die Notwendigkeit von Sec63p für ERAD zurückzuführen sind, oder ob die ER-Funktionsstüchtigkeit in dieser Mutante generell eingeschränkt ist (Rothblatt et al., 1989). Pilon et al. und Plemper et al. haben gezeigt, dass Sec71p, Sec72p und Sec62p für ERAD der getesteten Substrate nicht notwendig sind, was auf eine besondere Rolle des Sec63p außerhalb des Sec63-Komplexes hindeuten könnte (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997). In Hefe spielt Sec63p zusammen mit Sec71p und Sec72p ebenfalls eine Rolle bei der Fusion von Kernmembranen während der Verschmelzung der Kerne bei sich paarenden Hefezellen (Ng & Walter, 1996). Sec62p und Sec61p sind dabei nicht involviert (Ng & Walter, 1996).

Im Menschen existiert eine homologe Version von *SEC63*, die zu 53% ähnlich und zu 25,6% identisch mit dem Hefe-Protein ist (Skowronek et al., 1999; Meyer et al., 2000). Dieses *SEC63*-Gen und das *PRKCSH*-Gen (Protein Kinase C Substrat 80 K-H), das für die  $\beta$ -Untereinheit der Glukosidase II kodiert ( $\beta$ GII, Hepatocystin), stehen in Zusammenhang mit der autosomal dominanten polycystischen Leberkrankheit (ADPLD) (Davila et al., 2004; Waanders et al., 2010). Diese tritt oft zusammen mit der autosomal dominanten polycystischen Nierenkrankheit (ADPKD) auf, sie kann aber auch unabhängig von der ADPKD als ein eigenes Krankheitsbild auftreten (Fedeles et al., 2011). Bei der ADPLD bilden sich multiple Zysten biliären epithelialen Ursprungs (Zimmermann, 2009). Sie manifestiert sich meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (Qian et al., 2003). Die stark vergrößerte Leber kann Symptome wie Schmerzen im Abdomen und Kurzatmigkeit verursachen, weshalb ein chirurgischer Eingriff erforderlich sein kann (Qian et al., 2003). Die bei PLD-Patienten gefundenen *sec63*-Mutanten trugen Mutationen in allen Bereichen des Gens (Davila et al., 2004). Bisher wurden 21 verschiedene Mutationen gefunden (Waanders et al., 2010). Dabei wurden Leserasterverschiebungen nachgewiesen, sowie „nonsense“ und „missense“ Codons und Mutationen, die Spleiß-Donor-Akzeptor-Stellen zerstören (Waanders et al., 2010). ADPLD etabliert sich in einem sogenannten „Two-Hit“-Mechanismus, wobei eine Zelle, die ein mutiertes und eine gesundes *SEC63*-Allel trägt, das Wildtypallel bei der somatischen Mutation verliert (Watnick et al., 1998). Es scheint, dass das *SEC63*-Gen sehr anfällig für Mutationen ist und so können auch leicht beide Allele getroffen werden. Wie genau diese Krankheit durch Verlust von Sec63p verursacht wird, ist bisher noch nicht geklärt.

## 1.2 Endoplasmatisches-Retikulum-assoziierte-Degradation (ERAD)

Bei der Synthese und Faltung von sekretorischen Proteinen kommt es immer wieder zu Fehlern und somit zu Fehlfaltungen der Proteine oder zur Überladung des Qualitätskontrollsystems des ER (Vembar & Brodsky, 2008). Deshalb ist es für die Zelle und den Organismus von wesentlicher Bedeutung, diese zellulären Syntheseschritte einer genauen Kontrolle zu unterziehen und gegebenenfalls fehlerhafte Proteine zu entsorgen (Römisch, 2005). Dabei werden die fehlgefalteten Proteine wieder aus dem Lumen in das Cytoplasma transportiert und dort durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert (siehe Abb. 1.2; Römisch, 2005). Diesen Prozess nennt man ER-assoziierte Degradation (ERAD) (Vembar & Brodsky, 2008). Die

entstehenden Aminosäuren werden wiederum von der Zelle zum Wiederaufbau von Proteinen recycled (Lecker et al., 2006).

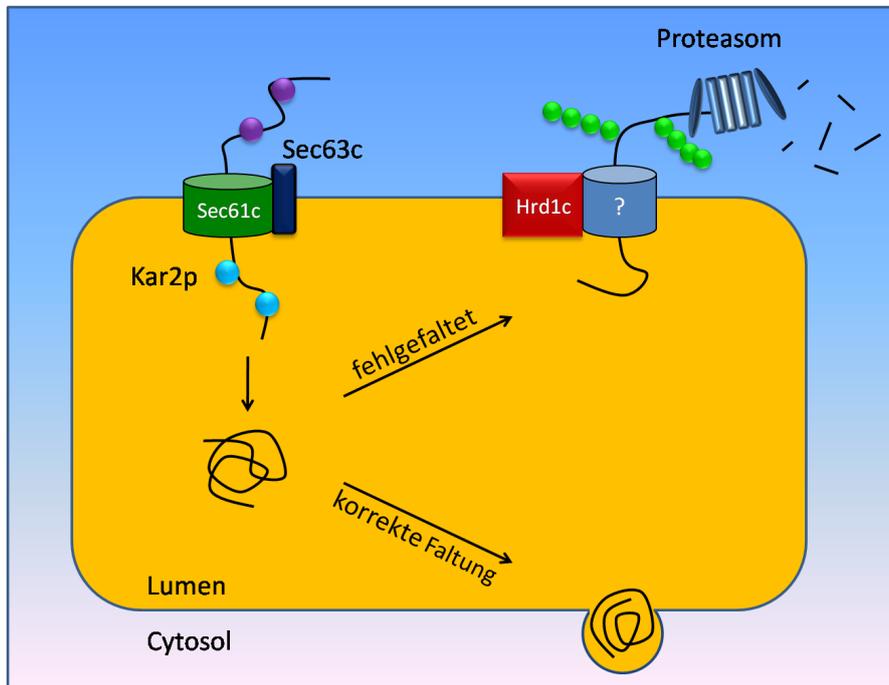


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der ER-assoziierten Degradation

In dieser Grafik ist das ER in orange dargestellt. Als Beispiel wird der posttranslationale Import eines Proteins gezeigt, das mit Hilfe von Chaperonen (violette Kreise) im Cytoplasma transportkompetent gehalten wird. Der Import des Proteins erfolgt über den Sec61-Komplex (Sec61c) mit dem daran angelagerten Sec63-Komplex (Sec63c). Das importierte Protein wird bei inkorrektter Faltung durch einen unbekannten Kanal (hellblauer Zylinder) exportiert, durch den Degradationskomplex Hrd1 (Hrd1c) ubiquitiniert (grüne Kreise) und von dem Proteasom abgebaut. Bei korrekter Faltung kann das Protein in die Membran eingebaut oder aus dem ER in einem Vesikel exportiert werden, um dem sekretorischen Weg zugeführt zu werden.

Man nahm ursprünglich an, dass die Degradation von Proteinen innerhalb des ER-Lumens stattfindet, aber in der Arbeit von Sommer & Jentsch, 1993, konnte ein Hinweis gefunden werden, dass ERAD auf cytoplasmatische Faktoren angewiesen sein könnte (Sommer & Jentsch, 1993; Klausner & Sitia, 1990). Dabei wurde eine temperatur-sensitive Mutante von Sec61p stabilisiert durch eine Disruption des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc6, das zusammen mit dem cytoplasmatischen Proteasom zuständig für Proteindegradation ist (Sommer & Jentsch, 1993). Bei den sogenannten Proteasomen handelt es sich um Protease-Komplexe, die die Proteinhomöostase in den Zellen durch die Eliminierung von defekten Proteinen erhalten (Lecker et al., 2006). Desweiteren ist der kontrollierte Abbau von Proteinen durch das Proteasom ein fester Bestandteil zahlreicher intrazellulärer Signalwege (Lecker et al.,

2006). Proteasomen kommen in allen Eukaryontenzellen vor, mit einer beachtlichen Menge von einem Prozent des Proteinanteils der Zelle (Voges et al., 1999).

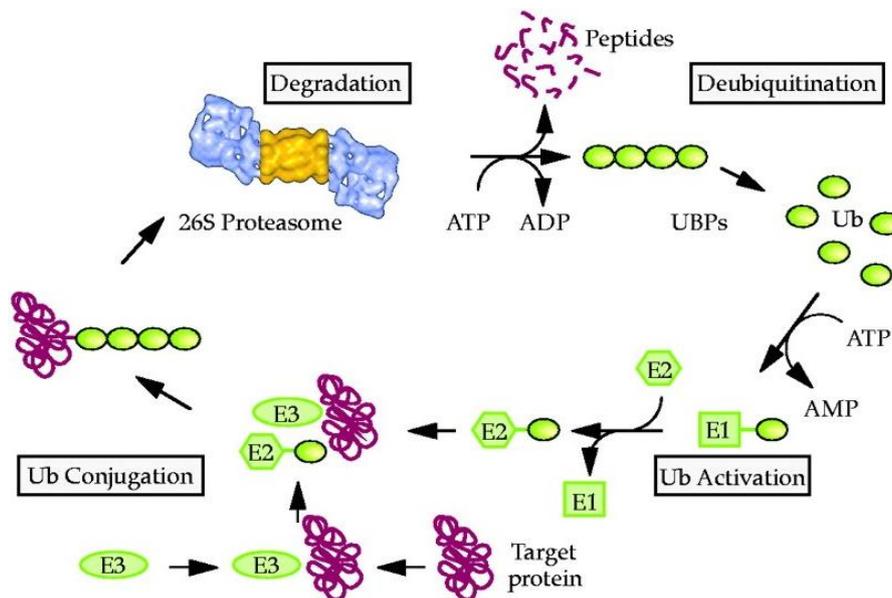


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Reaktionskaskade zur Detektion, Ubiquitinierung und Degradation eines Proteasomsubstrates

Ein E1-Enzym aktiviert das Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Weise. Das Ubiquitin wird auf ein E2-konjugierendes Enzym übertragen, welches anschließend an einen E3-Protein-Komplex assoziiert. Die E3-Ubiquitin-Ligase bindet das Ubiquitin an das zu degradierende Protein. Weitere Ubiquitine werden angefügt und das Protein wird zu dem 26S-Proteasom geführt, wo es ATP-abhängig degradiert wird (entnommen aus Voges et al., 1999).

Eine zentrale Rolle bei der Markierung von Proteasomsubstraten spielt das Protein Ubiquitin, das aus 76 Aminosäuren besteht (Voges et al., 1999). Bei Proteinen, die zum Abbau bestimmt sind, wird Ubiquitin oder Polyubiquitin kovalent mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten des Substrats verknüpft (Voges et al., 1999). Die Aufklärung dieser Ubiquitinierungsreaktionen und des folgenden Degradationsweges ubiquitiniertes Proteine wurde mit dem Nobelpreis für Chemie honoriert (Ciechanover et al., 1978; Hershko & Ciechanover, 1980). Abb. 1.3 zeigt, kurz zusammengefasst, die Reaktionskaskade nach der das zu degradierende Protein erkannt und der Ubiquitinierungsreaktion zugeführt wird. Ein E1-Enzym aktiviert das Ubiquitin ATP-abhängig (Voges et al., 1999). Das aktivierte Ubiquitin wird an E2-Proteine gebunden (Voges et al., 1999). Diese E2-Ubiquitinkonjugate interagieren mit E3-Substrat-Protein-Komplexen, wobei die Ubiquitinreste auf die Substratproteine übertragen werden (Voges et al., 1999). Abschließend erweitern E4-Ligasen die Polyubiquitinierung des Substratproteins (Voges et al., 1999). Mindestens vier Ubiquitin-Proteine sind notwendig, um

das Substrat der Degradation durch Proteasomen zuzuführen (siehe Abb. 1.3; Mukhopadhyay & Riezman, 2007). Das 26S-Proteasom baut anschließend die Substrate ATP-abhängig zu kurzen Peptiden ab (Voges et al., 1999).

Trotz der Vielfalt von Substraten ist es in der Regel ein einziger multi-funktionaler Proteasekomplex, der den Abbau katalysiert: Proteasomen unterscheiden sich von einfacheren Proteasen durch ihren Aufbau aus multiplen Untereinheiten, wie in Abb. 1.4 verdeutlicht wird. Das hier gezeigte 26S Proteasom besteht aus dem 20S-Core als katalytischem Komplex, der oft an einer oder beiden Seiten von einem 19S-regulatorischen Komplex flankiert ist (Girão et al., 2005; Voges et al., 1999). Der 19S-regulatorische Partikel gliedert sich in „base“ und „lid“, wobei der „base“ Bereich an die 20S-Untereinheit binden kann (Finley et al., 2012). Im Proteasom werden im 19S-Cap-Bereich die Ubiquitine von dem Substrat gelöst und anschließend in einen Bereich innerhalb des 20S-Core gebracht, wo die Degradation stattfindet (Finley et al., 2012).

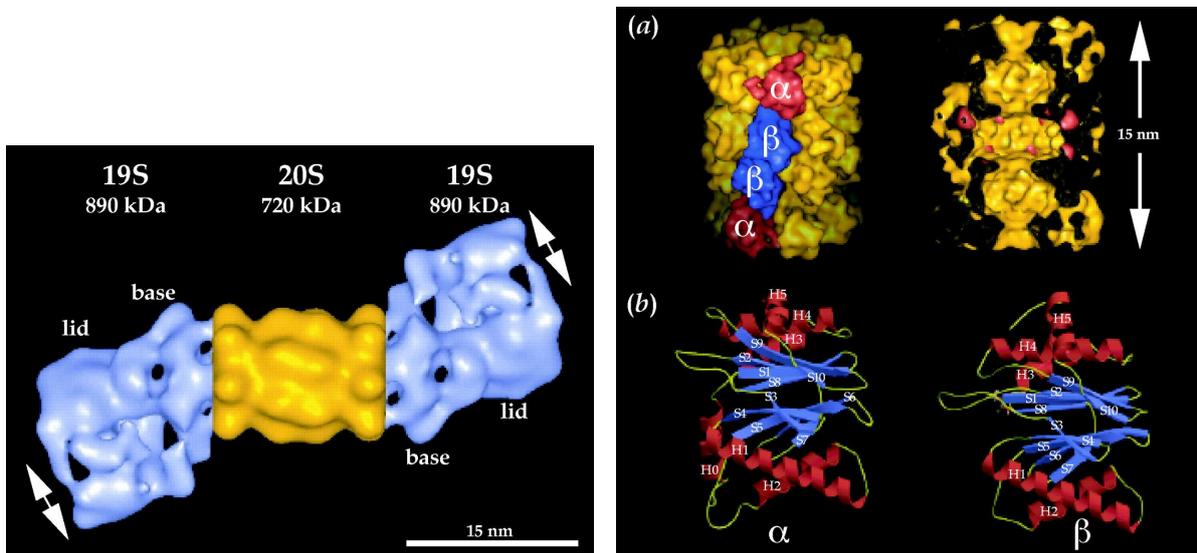


Abbildung 1.4: Struktureller Aufbau des 26S-Proteasoms

In der linken Abbildung ist ein drei-dimensionales Modell des 26S-Proteasoms aus *Drosophila* gezeigt. Dabei sind in blau die flankierenden 19S-regulatorischen Untereinheiten gezeigt, sowie die 20S-Untereinheit in gelb. In der Abbildung rechts ist die Struktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma* zu sehen, wobei im oberen Bereich (a) die Oberfläche dargestellt ist und der untere Teil (b) eine Sicht auf das Innere des Proteasoms mit drei Teilbereichen und 14 reaktiven Stellen gewährt (entnommen aus Voges et al., 1999).

Die 20S-Untereinheit wird aus vier ringförmigen Untereinheiten gebildet, wobei die beiden Äußeren als  $\alpha$  und die beiden Inneren als  $\beta$  bezeichnet werden (Finley et al., 2012). Im Inneren der 20S-Untereinheit, im Bereich der  $\beta$ -Ringe, sind die proteolytischen Stellen lokalisiert

(Finley et al., 2012). Im inneren Ring erfolgt der Proteinabbau durch die multikatalytische Protease (Finley et al., 2012). Diese setzt sich zusammen aus einer Caspase-ähnlichen Protease, welche hinter sauren Resten schneidet, einer Trypsin-ähnlichen Protease, die hinter basischen Aminosäuren aktiv die Polypeptidkette trennt und einer Chymotrypsin-ähnlichen Protease, welche nach großen hydrophoben Resten die Peptidbindung eliminiert (Groll et al., 2005). Die regulatorischen Strukturen an den Enden des Zylinders im Bereich der  $\alpha$ -Ringe erkennen spezifische Zielproteine, binden diese, falten sie auf und leiten sie in das katalytische Zentrum (Voges et al., 1999). Sie sind also für die Regulation des Eintritts der Substrate in das Innere des Proteasoms zuständig. Einige Proteine werden durch Proteasome vollständig abgebaut, andere in aktive und inaktive Bestandteile zerlegt (Voges et al., 1999). Viele Proteine werden durch Proteasomen abgebaut oder freigesetzt, was multiple Signalkaskaden der Zelle beeinflusst (Voges et al., 1999).

Die ERAD-Wege unterscheiden sich je nach Lokalisation der Fehlfaltung im Substratprotein (Vashist & Ng, 2004). Man kann sie in ERAD-M, -C und -L einteilen, je nachdem, ob sich die Mutation im Membranbereich, Cytosol oder Lumen befindet (Vashist & Ng, 2004; Carvalho et al., 2006; Huyer et al., 2004). Für die unterschiedlichen Wege sind auch verschiedene Degradationskomplexe zuständig (Xie & Ng, 2010). Dabei handelt es sich um den Hrd1- und den Doa10-Komplex, die nach ihren E3-Ubiquitin-Ligasen benannt sind (Huyer et al., 2004). Die Erkennung der Fehlfaltungen folgt einer bestimmten Reihenfolge (Vashist & Ng, 2004). Zeigt ein Transmembranprotein Mutationen sowohl im cytoplasmatischen Bereich wie auch in einer Membrandomäne oder einer luminalen Domäne, so wird es dem ERAD-C-Weg zugeführt (Vashist & Ng, 2004).

Proteine, die luminalen Defekte haben, werden von dem Hrd1-Komplex erkannt und ubiquitiniert (Ismail & Ng, 2006). Dieser setzt sich zusammen aus der E3-Ligase Hrd1p, dem E2-konjugierenden Enzym Ubc7p mit dessen Membrananker Cue1p (Biederer et al., 1997). Desweiteren sind noch Der1p und Usa1p, sowie der Cdc48-Komplex (Cdc48p mit Npl4p und Ufd1p) mit Ubx2p Teil des Komplexes (Vembar & Brodsky, 2008). Ubx2p stellt die Verbindung des Cdc48-Komplexes („cell division cycle-48“) zur ER-Membran dar (Neuber et al., 2005). Zur Erkennung N-glykosylierter ERAD-Substrate wird das luminalen Lectin Yos9p („yeast osteosarcoma 9“) benötigt, das zusammen mit Hrd3p und Kar2p an fehlgefaltete Glycoproteine bindet (Denic et al., 2006). Yos9p interagiert dabei mit der luminalen Domäne von Hrd3p (Denic et al., 2006).

Für die Degradation von Proteinen mit Läsionen in einer Membrandomäne wird der ERAD-M-Komplex benötigt (Ismail & Ng, 2006). Dieser teilt sich einige Bestandteile mit dem ERAD-L-Komplex, er ist jedoch etwas kleiner, da er ohne Der1p und Usa1p auskommt

(Ismail & Ng, 2006). Der ERAD-M Weg benötigt lediglich Hrd1p, Hrd3p, Ubc7p, Cue1p, Ubx2p und den ATP-geladenen Cdc48-Komplex (Ismail & Ng, 2006). Der Doa10-Komplex ist für die Degradation von Substraten mit fehlgefalteter, cytosolischer Domäne zuständig (Ismail & Ng, 2006). Außer dem Cdc48-Komplex ist nur der E2-Komplex Ubc7p mit Cue1p in diesem Degradationskomplex assoziiert (Ismail & Ng, 2006). Die Erkennung von fehlgefalteten Substraten kann speziell bei den Substraten für den ERAD-L-Weg über freiliegende hydrophobe Regionen, nichtgebundene Cysteine oder über die Zuckerstruktur geschehen (Meusser et al., 2005).

N-glykosylierte Proteine entstehen durch Transfer eines GlcNAc2-Man9-Glc3-Restes auf die Sequenz Asn-X-Ser/Thr im Zielprotein (Helenius & Aebi, 2004). Anschließend erfolgt ein sequenzielles „Trimming“ der drei Glukosereste (Helenius & Aebi, 2004). Zunächst wird der erste Glukoserest durch die Glukosidase I entfernt und darauf folgend die zweite Glukose durch die Glukosidase II (Hitt & Wolf, 2004). Dadurch wird es dem Glykoprotein ermöglicht, in Säugern zur weiteren Qualitätskontrolle dem Calnexin/Calretikulin-Faltungszyklus zugeführt zu werden (Helenius & Aebi, 2004; Suh et al., 1989). Falls die Faltung des Proteins die Qualitätskontrolle besteht, wird der letzte Glukoserest durch die Glukosidase II abgespalten und aus dem Faltungszyklus entlassen (Ruddock & Molinari, 2006). Weiterhin wird das Protein aus dem ER exportiert und seinem Bestimmungsort zugeführt (Vembar & Brodsky, 2008). Falls die Faltung nicht abgeschlossen ist, wird es von der UDP-Glukose:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) erkannt und mit einem Glukoserest versehen (Taylor et al., 2003). Dieses monoglykosylierte Substrat tritt anschließend wieder in den Faltungszyklus ein (Caramelo & Parodi, 2008). In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) gibt es jedoch nur das Calnexin-Homolog Cnel, aber kein Homolog von UGGT (Xu et al., 2004; Vembar & Brodsky, 2008). Die weitere Modifikation des N-Glykosylrestes erfolgt anschließend durch Mannosidase I; sie spaltet die Mannose 9 ab, so dass keine Glukose mehr angefügt werden kann (Jakob et al., 2001). Die Mannosidase I hat eine sehr langsame enzymatische Aktivität, weshalb angenommen wurde, dass es sich um eine Art „Timer“ für Proteinfaltung im ER handelt (Jakob et al., 1998). Wenn die Proteine, die sich in diesem Faltungszyklus befinden, nach der Spaltung des mittleren terminalen  $\alpha$  1,2-gebundenen Mannoserestes noch in einem ungefalteten oder missgefalteten Zustand vorliegen, werden sie als fehlerhaft angesehen und degradiert (Helenius & Aebi, 2004).

Als Rezeptor für die erwähnte Glykanstruktur galten lange Htm1p in Hefe mit den Säuger-Homologen EDEM 1, 2 und 3 („ER-degradation-enhancing- $\alpha$  mannose-like protein“) (Kanehara et al., 2007). Ein zweiter Kandidat war Yos9p, welches an einem  $\alpha$  1,6 Mannoserest binden kann (Quan et al., 2008; Buschhorn et al., 2004; Kim et al., 2005). Von Yos9p exis-

tieren die homologen Versionen OS-9 und XTP3-B in Mammalia, die erstmals in humanem Krebsgewebe (OS-9: Su et al., 1996) und in *Xenopus* (XTP3-B: Cruciat et al., 2006) nachgewiesen werden konnten. Clerc et al. konnten 2009 zeigen, dass Htm1p kein Lectin ist, sondern als Mannosidase agiert, die den  $\alpha$  1,6 Mannose-Rest freilegt, an den Yos9p dann binden kann und somit ERAD-Substrate detektiert werden können (Clerc et al., 2009). Hingegen wird die Erkennung von ERAD-Substraten unabhängig von der Glykosylierung direkt durch Hrd1p vermittelt (Sato et al., 2009). Die Erkennung der Läsionen, die in der Membran lokalisiert sind, wird wahrscheinlich über die Transmembrandomänen von Hrd1p vermittelt (Sato et al., 2009).

Nach der Hrd1p-Erkennung des ERAD-Substrats wird es durch einen Kanal über die Membran auf die cytosolische Seite befördert (Vembar & Brodsky, 2008). Welches Protein diesen Retrotranslokationskanal bildet, ist umstritten. Es gibt einige Hinweise, dass es sich um den Sec61-Komplex handeln könnte (Pilon et al., 1997; Ng et al., 2007). Von Pilon et al., 1997 wurde in Mikrosomen von kalt-sensitiven *sec61*-Mutanten eine Stabilisierung von unglykosyliertem p $\alpha$ F nachgewiesen (Pilon et al., 1997) und mittels Pulse-Chase-Experimenten konnte ebenfalls eine langsamere Degradation des ERAD-Substrats CPY\* gezeigt werden (Plempner et al., 1997). Außerdem wurde die Interaktion von Sec61p sowohl mit Proteasomen (Ng et al., 2007) als auch mit Hrd1p und Hrd3p nachgewiesen (Plempner et al., 1999a). Diese Komponenten sind, wie bereits erwähnt, Teil der Degradationskomplexe und von wesentlicher Bedeutung bei der Ubiquitinierung und Extraktion von ERAD-Substraten (Vembar & Brodsky, 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Sec61p mit verschiedenen ERAD-Substraten vor deren Degradation assoziiert ist (Wiertz et al., 1996; Scott & Schekman, 2008; Schäfer & Wolf, 2009).

Es gibt aber auch Hinweise, dass Der1p, bzw. das Säuger-Homolog Derlin-1 den Exportkanal bilden könnte (Wahlman et al., 2007; Lilley & Ploegh, 2004). Zum Beispiel konnte der Export des pro- $\alpha$ -Faktors durch Antikörper gegen Derlin-1 geblockt werden und nicht durch Antikörper gegen Sec61p (Wahlman et al., 2007; Lilley & Ploegh, 2004).

Nachdem die ERAD-Substrate durch den Kanal die cytosolische Seite der Membran erreichen, erfolgt die Ubiquitinierung (Finley et al., 2012). Die Extraktion der ERAD-Substrate von der ER-Membran wird möglicherweise durch den Cdc48-Komplex unter ATP-Verbrauch vermittelt (Jentsch & Rumpf, 2007). Bei Cdc48p handelt es sich um eine hexamere AAA<sup>+</sup>-ATPase, die ihre Segregase-Funktion nutzt, um Proteine von ihren Komplexen oder Bindungspartnern zu entfernen (Jentsch & Rumpf, 2007). Die genaue Aufgabe des Cdc48-Komplexes während des ERAD ist nicht genau geklärt. Möglicherweise trennt der Cdc48-Komplex nicht-ubiquitinierte von ubiquitinierten Proteinen nach Transport auf die cytosolische Seite der

ER-Membran oder, wie oben erwähnt, extrahiert sie aktiv ERAD-Substrate aus dem ER, um sie dem Proteasom zur Degradation zuzuführen (Rape et al., 2001; Neuber et al., 2005; Ye et al., 2001; Bays et al., 2001). Cdc48p interagiert dabei mit der „Cap“ des 26S Proteasoms (Verma et al., 2000).

Der Abbau von fehlgefalteten Proteinen ist in einer Reihe von Krankheiten involviert (Yoshida, 2007). Das wahrscheinlich wichtigste Beispiel ist die Degradation des CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) der normalerweise in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert ist und als Chlorid-Kanal dient (Ward et al., 1995). Die häufigste Mutation in diesem Protein ist die Deletion eines Phenylalanins an Stelle 508 (Kerem et al., 1990). Eigentlich wäre dieser Chloridkanal selbst mit der Mutation funktional wenn er die Plasmamembran erreichen würde, jedoch wird der Kanal durch die Mutation im ER als fehlgefaltet erkannt und der Degradation zugeführt (Ward et al., 1995).

Ein weiteres Beispiel ist die Alpha 1 anti-Trypsin Defizienz (Dafforn et al., 1999). Dabei handelt es sich um einen Proteaseinhibitor, der hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird und anschließend über das Blut in die Lunge gelangt, wo es seine Schutzfunktion vor Proteasen ausübt (Dafforn et al., 1999). Sind Patienten Träger eines Z-Allels, das für eine fehlerhafte Version dieses Proteins codiert, wird das Protein in den Leberzellen im ER abgebaut (Dafforn et al., 1999). Dadurch ist der Serumlevel dieses Proteins um ein Vielfaches niedriger als in gesunden Menschen (Brode et al., 2012). Infolgedessen wird die Lunge anfällig und die Leberzellen durch die gebildeten Polymere und konstanten ER Stress stark geschädigt (Brode et al., 2012). Viele Krankheiten, wie Alzheimer oder Chorea Huntington, werden aber auch dadurch verursacht, dass bestimmte Proteine nicht oder ungenügend degradiert werden, was zu deren Akkumulation führt (Yoshida, 2007).

### 1.3 DnaJ-Domänen-Proteine

Bei der Faltung und Synthese von Proteinen ist die Assistenz von Chaperonen entscheidend, welche an hydrophobe Regionen von Proteinen binden und somit vorzeitige Faltung verhindern (Jonikas et al., 2009). Zu den wichtigsten gehören die Chaperone der Hsp70-Klasse, denen auch Kar2p zugeordnet wird (Sousa & Lafer, 2006). Diese Proteine haben ein Molekulargewicht von 70 kDa und werden speziell bei zellulärem Stress, wie Hitze, Störung des ERAD oder der UPR hochreguliert (Fewell et al., 2001). Wichtige strukturelle Merkmale der Hsp70-Proteine sind eine Nukleotid-Binde-Domäne (NBD), sowie eine Substrat-Binde-Domäne (SBD) (Flaherty et al., 1990; Sousa & Lafer, 2006). Wenn ein ATP-Nukleotid in der NBD gebunden wird, führt dies zu einer Konformationsänderung, wodurch das Chaperon das

gebundene Substrat entlässt (Sousa & Lafer, 2006). Diese Strukturänderung wird umgekehrt bei der Hydrolyse des ATP zu ADP + P (Sousa & Lafer, 2006). Die ATPase-Aktivität wird durch die Hilfe von Hsp40-Cochaperonen aktiviert (Sousa & Lafer, 2006). Die Klasse der Hsp40-Cochaperone ist durch drei Merkmale gekennzeichnet (Sousa & Lafer, 2006):

- eine N-terminale DnaJ-Domäne
- eine Zinkfinger-Domäne, die durch eine Glycin/Phenylalanin reiche Region (G/F reiche Domäne) mit dem N-terminalen Teil verbunden ist
- eine C-terminale Domäne

In *S. cerevisiae* gibt es 22 DnaJ-Proteine, die je nach vorhandenen Charakteristika in drei Klassen eingeteilt werden (Walsh et al., 2004). Typ I DnaJ-Proteine sind Homologe, die alle drei oben genannten strukturellen Merkmale tragen (Walsh et al., 2004). Bei Typ II Proteinen fehlt die Zinkfingerdomäne und bei den Typ III-Proteinen schließlich, ist nur die DnaJ-Domäne vorhanden (Cheetham & Caplan, 1998; Walsh et al., 2004). Der am stärksten konservierte Abschnitt dabei ist die DnaJ-Domäne, die ihren Namen einem Motiv des *E. coli* DnaJ-Proteins verdankt (Georgopoulos et al., 1980). Die DnaJ-Domäne wird aus vier  $\alpha$ -Helices gebildet (Walsh et al., 2004). In der Schleife zwischen Helix II und III an der Stelle 31-33 liegt ein konserviertes Motiv, bestehend aus Histidin, Prolin und Aspartat (HPD-Motiv), das von essentieller Bedeutung für die Bindung mit Hsp70-Proteinen ist (Qian et al., 1996). Dabei sind vor allem die Aminosäuren 1-35, die die Helix I und II mit dem HPD-Motiv umfassen, entscheidend für die Interaktion mit Hsp70-Chaperonen (Greene et al., 1998). Zwei andere Merkmale der DnaJ-Domäne sind die lysinreiche Oberfläche der Helix II und einige spezielle Aminosäuren, die zur Packung und Stabilisierung der Helices dienen (Walsh et al., 2004).

Zu den DnaJ-Domänen-Proteinen zählt auch das bereits erwähnte Typ III-Protein Sec63p, das die DnaJ-Domäne zwischen Transmembrandomäne 2 und 3 trägt, worüber die Interaktion mit Kar2p vermittelt wird (Walsh et al., 2004). Diese ist von wesentlicher Bedeutung bei dem posttranslationalen Proteinimport (Lyman & Schekman, 1995). Außer Sec63p gibt es auch das DnaJ-Protein Swa2p, das ebenfalls bei der Rekrutierung von einem speziellen Hsp70-Chaperon zu einer Stelle in der Zelle dient (Lemmon, 2001). Im Fall von dem cytoplasmatischen Swa2p wird Ssa1/2 an Clathrin-bedeckte Vesikel geführt, um bei der Disassemblierung zu assistieren (Lemmon, 2001).

Es ist weiterhin bekannt, dass verschiedene Chaperone an der Degradation von Proteinen beteiligt sind (Stolz & Wolf, 2010). Dabei muss unterschieden werden, ob es sich um lösliche

oder transmembrane Proteine handelt (Stolz & Wolf, 2010). Es wurde gezeigt, dass Mitglieder der Ssa-Chaperone bei der Degradation eines CPY\* Konstrukts benötigt werden, wenn an dieses eine Transmembrandomäne, sowie ein cytoplasmatisches GFP angefügt sind (Taxis et al., 2003). Bei einfachem CPY\*, wie auch bei der Transmembranvariante ohne GFP, ist Ssa1p nicht notwendig für die Degradation (Taxis et al., 2003). Kar2p steht hingegen nur in Zusammenhang mit der Degradation der löslichen Form von CPY\* (Nishikawa et al., 2001; Taxis et al., 2003). Dabei interagiert Kar2p mit den DnaJ-Proteinen Jem1p (Typ III) und Scj1p (Typ I), die jedoch, im Gegensatz zu Sec63p, in löslicher Form vorliegen (Nishikawa et al., 2001). Eine Verzögerung der Degradation ist nur bei einer Deletion von Jem1p und Scj1p nachgewiesen, was auf eine Überschneidung ihrer Aufgaben hindeutet (Nishikawa et al., 2001; Silberstein et al., 1998).

## 1.4 „Unfolded Protein Response“ (UPR)

Die Proteinlast, die in die Membran des ER eingebaut oder dem Sekretionsweg zugeführt wird, kann stark variieren (Walter & Ron, 2011). Diese Proteine müssen innerhalb des ER gefaltet werden und reifen, wobei die Zelle auf unterschiedliche Proteinmengen reagieren und die Faltungskapazität anpassen muss (Fewell et al., 2001; Walter & Ron, 2011). Dieser Regulationsmechanismus der Zelle wird als „Unfolded Protein Response“ (UPR) bezeichnet (Walter & Ron, 2011). Falls die Menge an fehlgefalteten Proteinen zu hoch ist, werden Signalwege aktiviert, die zur Expression verschiedener Proteine führen, die diesen unerwünschten Zustand der Zelle abmildern (Travers et al., 2000). Dabei handelt es sich meist um Chaperone, aber auch um Komponenten des Translokationsapparates oder der Glykosylierung (Travers et al., 2000). Zusätzlich wird in Metazoen die Proteinbiosynthese verlangsamt, um die Proteinlast zu verringern (Mori, 2009).

In Mammalia wird die UPR über drei verschiedene Proteine, die alle in der ER-Membran lokalisiert sind, aktiviert (Mori, 2009). Diese Proteine gliedern sich in einen luminalen Teil, der den Faltungsstatus im ER wahrnimmt und einen cytoplasmatischen Teil, welcher Einfluss auf die Translation und Transkription der Zelle nimmt (Ron & Walter, 2007). Im Säuger sind diese Proteine „Inositol-requiring protein-1“ (Ire1p), „activating-transcription factor-6“ (ATF6) und „protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase“ (PERK) (Ron & Walter, 2007). Durch diese Schlüssel-Proteine spaltet sich die UPR in drei Wege, die sich während der Evolution von niedrigeren zu höheren Organismen etabliert haben, wodurch in Hefe nur der Ire1p-Weg vorhanden ist und in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* nur Ire1p und ein PERK-Homolog zu finden sind (Mori, 2009).

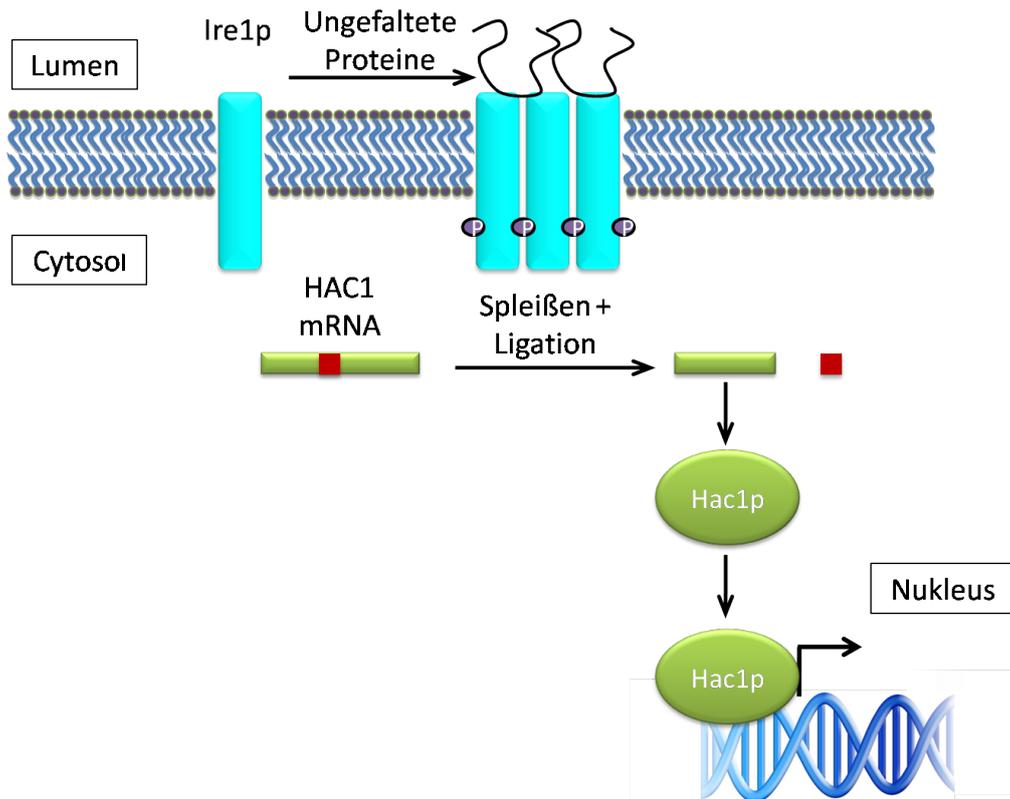


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Ire1p-Signalweges

Ire1p oligomerisiert bei Erkennung von fehlgefalteten Proteinen und Autophosphorylierung findet statt (gekennzeichnet durch P in violetterm Hintergrund). Daraufhin wird die *HAC1*-mRNA durch Ire1p gespleißt (Exons sind grün gefärbt, das Intron rot). Die Exons werden ligiert und die mRNA translatiert. Der entstandene Transkriptionsfaktor initiiert im Nucleus die Expression von UPR-Proteinen.

Wie in Abb. 1.5 dargestellt ist, lagern sich Ire1p-Proteine bei Induktion der UPR zusammen und autophosphorylieren sich gegenseitig mit Hilfe ihrer Kinase-Domäne, die sich im Cytoplasma befindet (Cox et al., 1993; Mori et al., 1993; Shamu & Walter, 1996). Daraufhin wird die RNase-Funktion von Ire1p ausgelöst, wodurch in Hefe die mRNA von *HAC1* gespleißt wird (Cox & Walter, 1996). In Metazoen entspricht Hac1p dem X-Box Bindeprotein-1 (Xbp1) (Yoshida et al., 2001). In der Hefe wird das Verbinden der Exons durch die tRNA-Ligase vermittelt (Sidrauski et al., 1996), dadurch entsteht eine reife mRNA, die für einen basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor kodiert, der im Nucleus an das sogenannte UPR-Element (UPRE) in der Promoterregion bindet und dadurch die Expression von verschiedenen Proteinen aktiviert (Mori et al., 1998). Wie genau Ire1p aktiviert wird, ist noch weitgehend unklar, wobei wahrscheinlich mehrere Faktoren dabei eine Rolle spielen. Es wird vermutet, dass BiP

in nicht-induziertem Zustand an den luminalen Teil von Ire1p gebunden ist und bei größerer Menge an ungefalteten Proteinen im ER dissoziiert, um bei deren Faltung zu assistieren (Ron & Walter, 2007). Es ist auch möglich, dass Ire1p direkt ungefaltete Proteine detektieren kann (Bertolotti et al., 2000; Credle et al., 2005).

In Metazoen ist zur Induktion der UPR neben dem Ire1p-Weg noch der PERK-Weg vorhanden (Mori, 2009). Dabei kommt es bei PERK ähnlich wie bei Ire1p zu einer Zusammenlagerung und Trans-Autophosphorylierung von PERK (Mori, 2009). Zusätzlich wird die  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2 $\alpha$ ) durch PERK phosphoryliert (Mori, 2009). Dadurch wird der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor eIF2B gestört, was verhindert, dass eIF2 seine aktive GTP-gebundene Form annehmen kann (Harding et al., 1999). Dies führt zu einer Verminderung der Initiation der Translation und die Proteinlast innerhalb der Zelle wird vermindert (Harding et al., 1999).

ATF6 reguliert den dritten UPR-Weg in Mammalia (Ron & Walter, 2007). Bei ATF6 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der an die Membran des ER gebunden ist (Ron & Walter, 2007). Wenn die UPR induziert ist, wird ATF6 zum Golgi-Apparat transportiert, wo es von den Proteasen SP1 und SP2 geschnitten wird (Ron & Walter, 2007). Anschließend funktioniert das ATF6-Fragment im Nukleus als Transkriptionsfaktor und veranlasst dort die Expression von UPR-induzierten Proteinen (Haze et al., 1999).

UPR und ERAD stehen in der Zelle in engem Kontakt und die Degradation von misgefalteten Proteinen über den ERAD-Weg wird stark durch die UPR reguliert (Travers et al., 2000; Friedlander et al., 2000). Dies wird ausführlich in der Publikation von Travers et al., 2000 gezeigt (Travers et al., 2000). Travers und Kollegen konnten zeigen, dass Proteine wie Der1p und Hrd1p, die einen Teil des Degradationskomplexes bilden, bei UPR-Induktion hochreguliert werden (Travers et al., 2000). Ebenfalls sind Proteine des Translokons, wie Sec61p, Chaperone und Teile des Lipidmetabolismus dieser Regulation unterworfen (Travers et al., 2000; Friedlander et al., 2000). All diese Mechanismen stellen Maßnahmen der Zelle dar, das Übermaß an toxischen fehlgefalteten Proteinen im ER zu reduzieren (Ron & Walter, 2007). Final steht am Ende dieser Faltungsversuche die Degradation dieser Proteine über ERAD, um die Proteine aus dem System zu entfernen und dadurch die Zelle zu schützen (Ron & Walter, 2007).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Plemper et al., 1997 und Pilon et al., 1997 testeten eine Mutante des DnaJ-Proteins Sec63p, *sec63-1*, auf Degradationsdefekte bei den löslichen ERAD-Substraten CPY\* und dem unglykosylierten  $\alpha$ -Faktor (Plemper et al., 1997; Pilon et al., 1997). Diese Mutante trägt eine Mutation in der DnaJ-Domäne, welche als Interaktionsbereich mit Kar2p dient (Scidmore et al., 1993). Es konnte bei beiden Substraten eine leichte Verzögerung der Degradation festgestellt werden (Plemper et al., 1997; Pilon et al., 1997). Die Mutante *sec63-1* ist allerdings „leaky“, was heißt, dass die Aktivität dieses Allels eingeschränkt ist (Plemper et al., 1997; Pilon et al., 1997). Dies kann einen Effekt auf die Funktionstüchtigkeit des ER haben, was auch durch die langsame Verdopplungszeit dieser Hefe-Mutante bestätigt wird. Ein weiterer Hinweis auf die Involvierung von Sec63p in den ER-Export-Weg lieferte die Publikation von Ng et al., 2007 (Ng et al., 2007). Darin wird Sec63p, unabhängig von den anderen Proteinen des Sec63-Komplexes, mit ER-assoziierten Proteasomen gefällt, mit dem daran gebundenen Chaperon Kar2p (Ng et al., 2007).

In dieser Arbeit galt es nun die Rolle von Sec63p bei ERAD von fehlgefalteten Proteinen genauer zu untersuchen. Da bisher nur die Mutante *sec63-1* ausführlich getestet wurde, sollten zunächst weitere *sec63*-Mutanten mittels error-prone-PCR generiert werden und in einem Screen auf Akkumulation von CPY\* untersucht werden.

Nach Sequenzierung dieser Mutanten sollten anschließend ihre allgemeinen Charakteristika, wie Temperatur- und Stresssensitivität, post- bzw. cotranslationale Importdefekte und Induktion der UPR bestimmt werden. Anhand der Untersuchung von ERAD verschiedener löslicher und transmembraner ERAD-Substrate sollte die Substratspezifität von Sec63p weiter analysiert werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es zu eruieren, inwieweit Degradationsdefekte von einer bestimmten Region des Proteins abhängig sind. Dazu sollten die Punktmutationen in den einzelnen Domänen selektiv untersucht werden. Voraussetzung dazu war die Vereinzelung der Domänen dieser Mutanten durch Klonierung. Die erhaltenen Mutanten sollten anschließend auf Korrelation von bestimmten Eigenschaften und Lokalisation der Mutationen analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Chemikalien

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte (siehe Tab. 2.1), Verbrauchsmaterialien (siehe Tab. 2.2), Kits (siehe Tab. 2.3) und Chemikalien (siehe Tab. 2.4) verwendet. Deren Hersteller sind angegeben.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Geräte	Hersteller
Agarosegel-Dokumentationssystem E-Box VX2	PeqLab
Autoklav	Systec
BeadBeater	Biospec Products
BioradPowerPac HC; -1000	Biorad
Blotting-System Trans-Blot Cells	Bio-Rad laboratories
DNA-Gelelektrophorese-System	Life technologies Horizon 58
Dokumentationssystem Universal HoodII	Biorad
Elektronische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Entwicklermaschine inklusive Fixier- und Entwicklerlösungen	AGFA
Eraser für Phosphor Screens	GE Healthcare
Geltrockner	BioRad
Gene Pulser Electroporation System	BioRad
Hyperkassette	GE Healthcare
ÄKTA Purifier	GE Healthcare
Inkubator, 30 °C	Innova New Brunswick Scientific Edison NY, USA
Inkubator für alle anderen Temperaturen	Infors HT
Magnetrührer	Neolab

Mikromanipulator (Singer MSM System series 300)	Singer instruments
Mikroplatten-„Reader“, Modell 680XR	Biorad
Mikroskop	Leitz Wetzlar
MSE Soniprep 150	Curtin Matheson Scientific Inc.
PCR-Cycler Peqstar 2x gradient	Peqlab
pH-Meter	Denver Instruments
Photometer	Amersham Biosciences
Pipetten	Gilson
Rotationsrad	Neolab
Schüttler	Rotates Shaker Luckham
SDS-Gelelektrophoresekammer X-Cell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen life Technologies
Storage Phosphor & Screen	GE Healthcare
Thermomixer	Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus
Typhoon Phosphorimager	GE Healthcare
Vakuumverdampfer („Speed-vac“)	Eppendorf
Vortexer	Marienfeld; Scientific Industries Vortex Genie
Waage	Sartorius
Wasseraufbereiter	Millipore
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen: MiniSpin Tischzentrifuge, kühlbar Tischzentrifuge PCR-Tischzentrifuge Sorvall Ultrazentrifuge Optima L-90K Zentrifuge für 15 ml und 50 ml Rörchen	Eppendorf Eppendorf Sigma 2-168 Neolab Sorvall EvolutionRC Beckman Coulter Sigma 4K15

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatographie-Papier (Whatman™)	GE Healthcare
Dialyseschläuche	Serva
Einweg Küvetten 1ml	Sarstedt
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner
Handschuhe, Latex, Nitril	VWR
HiTrap FF Crude Säulen (5 ml)	GE Healthcare
Hyperkassette	GE Healthcare
Kryotubes	Corning
leere Gelkassetten	Invitrogen
Nitrocellulose	Biorad
Objektträger super premium microscope slides	BDH
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (Premium Tips)	Biozym
Quarzküvette 105.202.008-QS	Hellma
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, PCR-Tubes	Sarstedt
Röntgenfilme Medical X-Ray Films	Fuji
Serologische Einwegpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Spritzen 30 ml, 50 ml	VWR
Steilfilter Filtropur S plus 0,2	Sarstedt
Vakuumfiltrationsgeräte 250 ml, 500 ml	NALGENE Labware
Ultrafiltrationsröhrchen (Vivaspin MWCO 30,000)	Sartorius

Tabelle 2.3: Verwendete Kits mit Herstellerangaben

Kit	Hersteller
Minipräparationskit (Invisorb Spin Plasmid Mini Two)	Invitek
Maxipräparationskit (GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit) GenElute™ Gel Extraction Kit GenElute™ PCR-Clean-Up Kit	Sigma Life Science

Tabelle 2.4: Verwendete Chemikalien und Enzyme mit Herstellerangaben

Chemikalien und Enzyme	Hersteller
SDS, Ampicillin, Tunicamycin, Lachssperma-DNA	AppliChem
Casaminsäuren, Hefeextrakt, Pepton, Yeast Nitrogen Base with/without ammonium sulfate	BD
Cycloheximid	Calbiochem
Proteinmarker PageRuler Prestained Marker, DNA-Marker 1kb GeneRuler, dNTPs, T4-Ligase, <i>Taq</i> -Polymerase	Fermentas
Methanol	Fisher-Scientific
Trypton	Fluka
Synthetic Complete Medium (d/o Ade, His, Leu, Lys, Trp, Ura)	FORMEDIUM
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
KCl, NaAc	Grüssing
Agarose, electrophoresis grade	Invitrogen
Crimson LongAmp <sup>®</sup> <i>Taq</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs
[S35] Methionin-Cystein Promix, 14-C Marker	Perkin Elmer
KAPAHIFI <sup>™</sup> Polymerase	Peqlab
Agar, Ethidiumbromid, Guanidin-Hydrochlorid, Hefeextrakt, Pepton, Triton X-100, Urea	Roth
Aminosäuren, $\beta$ -Glucuronidase, Bromphenolblau, D-(+)-Galaktose, D-(+)-Glukose, DMSO, EDTA, DTT, Ethanol absolut, Glasperlen (acid washed), LiAc, NaCl, Natriumazid, Nourseothricin Sulfat, PEG4000, D-(+)-Raffinose, Tris, Tween 20	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver, leicht löslich	Sucofin
ECL, Super Signal West Pico	Thermo Scientific
Glycin, KAc	VWR
Aceton, Ethanol vergällt, Essigsäure, Glycerol, Salzsäure, Isopropanol	ZChL
Restriktionsenzyme	NEB oder Fermentas

## 2.2 Organismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Bakterien- und Hefestämme wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität des Saarlandes entnommen oder hinzugefügt. Sie sind in Tab. 2.5 und Tab. 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.5: Verwendete Hefestämme mit Genotyp und Quelle

Hefestamm	Genotyp	Quelle
W303-1C	<i>mata ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1oc can1-100 prc1-1</i>	Dieter Wolf
W303-1A	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1</i>	Susan Lindquist
DNY66	<i>mata ura3Δ99 leu2Δ1 trp1Δ99 ade2-101ochre sec63-201</i>	Davis Ng
DNY54	<i>mata ura3Δ99 leu2Δ1 trp1Δ99 ade2-101ochre</i>	Davis Ng
KRY160	<i>mata leu2-2,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 leu2-3,112::LEU + UPRE-lacZ Met+ ire1::TRP1</i>	Peter Walter
KRY880	<i>mata ade2-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 prc1-1 der1::natNT2</i>	diese Arbeit
KRY879	<i>mata ade2-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 der1::natNT2</i>	diese Arbeit
RSY1294	<i>mata can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec61::HIS3 [pDQ sec61-32]</i>	Rien Pilon, Randy Schekman
RSY51	<i>mata sec63-1 leu2-3,112 ura3-52 ade2-1 pep4-3</i>	Randy Schekman
KRY875	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1 [pPN1992]</i>	diese Arbeit
KRY920	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1 [pRS315-sec63-401]</i>	diese Arbeit
KRY921	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1 [pRS315-sec63-402]</i>	diese Arbeit
KRY922	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1 [pRS315-sec63-403]</i>	diese Arbeit
KRY923	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1 [pRS315-sec63-404]</i>	diese Arbeit

KRY924	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-405]	diese Arbeit
KRY925	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-406]	diese Arbeit
KRY926	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-404 Brl-Domäne]	diese Arbeit
KRY927	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-404 saure Domäne]	diese Arbeit
KRY928	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-405 Transmembrandomäne]	diese Arbeit
KRY929	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-405 Brl-Domäne]	diese Arbeit
KRY930	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-406 Brl-Domäne]	diese Arbeit
KRY931	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2 prc1-1</i> [pRS315-sec63-406 saure Domäne]	diese Arbeit
KRY949	<i>mata can1-100 his3-11,115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 sec63::natNT2</i> [pRS315-SEC63]	diese Arbeit

Tabelle 2.6: Verwendete Bakterienstämme mit Genotyp und Quelle

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi1 relA1</i>	urspr. Hanahan, 1985
BL21Gold (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB-mB)- dcm+ Tetr gal <math>\lambda</math>(DE3) endA Hte</i>	Stratagene

## 2.3 Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität des Saarlandes entnommen und sind in Tab. 2.7 dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.8 zu sehen und wurden von Sigma-Aldrich erworben. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide mit Verwendungszweck und Bezugsquelle bzw. Referenz

Plasmid	Verwendung	Quelle/Referenz
<i>CPY-URA3-pRS313</i>	Protein-Import-Assay	Ng et al., 1996
<i>DEG1::SEC62<sup>ProtA</sup>-pRS316</i>	<i>DEG1::SEC62<sup>ProtA</sup></i> unter Gal-Promoter	Scott & Schekman, 2008
<i>PHO8-URA3-pRS313</i>	Protein-Import-Assay	Ng et al., 1996
pDN436	CPY*-HA für Pulse-Chase	Davis Ng
pJC30	Kontrolle für pJC31: pJC31 ohne UPRE	Davis Ng
pJC31	UPRE- <i>LacZ</i> -pRS414 für $\beta$ -Galaktosidase-Assay	Davis Ng
pMR17	CPY-Fragment His-getaggt	Colin Stirling
pPN1992	<i>wtSEC63-pRS316</i>	Randy Schekman
pPN222	Sec63p-Überexpression	Davis Ng
pRS313	<i>HIS</i> -Vektor; Kontrolle für Protein-Import-Assay	Sikorski & Hieter, 1989
pRS315	<i>LEU2</i> -Vektor	Sikorski & Hieter, 1989
pRS316	<i>URA3</i> -Vektor	Sikorski & Hieter, 1989
pSM101	KWW	Vashist & Ng, 2004
pSM70	KHN	Vashist & Ng, 2004
pYM- <i>natNT2</i>	Deletionskassette	Janke et al., 2004
<i>sec61-2-LEU2-pRS315</i>	<i>sec61-2</i> in <i>LEU2</i> -Vektor	Vashist & Ng, 2004
<i>sec61-2-URA3-pRS316</i>	<i>sec61-2</i> in <i>URA3</i> -Vektor	Vashist & Ng, 2004

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide

Hier sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, ihre Sequenz in 5' > 3' Orientierung und Verwendung aufgelistet. Start- und Stopcodons sind fett markiert, Restriktionsschnittstellen sind grün gefärbt.

Primer	Sequenz 5' > 3'	Verwendung
del_neg_kontr_for	GTATGATGAGGCTAGTGAGACG	Negativkontrolle <i>SEC63</i> -Deletion
del_neg_kontr_rev	GTGCTCTTTATCTACGTTTCGGC	Negativkontrolle <i>SEC63</i> -Deletion
del_pos_kontr_rev	GCAGTGGTGAGTAACCATGC	Positivkontrolle <i>SEC63/DER1</i> - Deletion
del_pos_kontr_for/L1	CACTGAACAGTTGACACAGTC	Positivkontrolle <i>SEC63</i> -Deletion
der1_del_for	TACAGCAGAGATTTTCGTCACCAACA GAAGAAAAGCTAAAGCCCAAGCAAT <b>ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC</b>	<i>DER1</i> -Deletion
der1_del_rev	CAAGCGTTCACTTTTGTTATTGGTT TTTGGTAAATAAAAACGGCCTTTCC <b>TTTAATCGATGAATTCGAGCTCG</b>	<i>DER1</i> -Deletion
der1_del_kontr_for	AGGCCTACACAACGGAATC	Positivkontrolle <i>DER1</i> -Deletion
der1_del_neg_kontr_rev	GCGCCGTAATCGAATATCGA	Negativkontrolle <i>DER1</i> -Deletion
ep_BamHI_rev	CGGCC <b>GGATCC</b> GGAAACCTTGCAAT CAGTAGTGG	error-prone-PCR von <i>SEC63</i>
ep_SacI_for	CCGACG <b>GAGCTC</b> GCTC <b>ATGG</b> CCTTCG AACAAGTGG	error-prone-PCR von <i>SEC63</i>
L2	GTCGACCTGCAGCGTACG <b>CATT</b> GTG CTGTAATATGCAGTAT	<i>SEC63</i> -Deletion
L3	CGAGCTCGAATTCATCGAT <b>TAGATAT</b> AAGTGATTAGTATAGT	<i>SEC63</i> -Deletion
L4	CTATTTACCAGCAGTGGATG	<i>SEC63</i> -Deletion
l-mat	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	Bestimmung mating type

mat a	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	Bestimmung mating type
mat alpha	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	Bestimmung mating type
sec63_seq_rev	CTATTCTGGTGATTCATCATC	Sequenzierung <i>SEC63</i> -C-Terminus

Tabelle 2.9: Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, ihre Wirtsspezies, ihre Verdünnungen hinsichtlich verwendeter Methode und Bezugsquelle sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Antikörper	Spezies	Eingesetzte Menge	Quelle
Anti-CPY	Hase	IP: 10 µl	hergestellt von der Abteilung von Marting Jung in der medizinischen Biochemie, Homburg, nach einem Antigen, das im Rahmen dieser Arbeit nach einem Protokoll von Colin Stirling exprimiert wurde
Anti-Sec62p	Hase	WB: 1:2000	AG Schekman
Anti-Maus	Pferd	WB: 1:75000	Cell Signaling (Katnr. 7076) (sekundär)
Anti-β-Aktin	Maus	WB: 1:2000	Abcam Ltd. (Katnr.: mAbcam 8224)
Anti-Sec63p	Hase	WB: 1:2000	Colin Stirling
Anti-HA	Hase	IP: 3 µl	Covance/Hiss Diagnostics (Katnr.: PRB-101C)
Anti-Hase POX	Ziege	WB: 1:100000	Rockland (Katnr.: 611-1302) (sekundär)
Anti-ppαF	Hase	WB: 1:2000	hergestellt von der Firma Davids Biotechnologie in Regensburg nach einem Antigen, das im Rahmen dieser Arbeit nach Bush et al., 1991 exprimiert wurde

## 2.4 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli*-Bakterien erfolgte in LB-Medium bei 37 °C. Falls es sich um eine Flüssigkultur handelte, wurde diese bei 220 rpm geschüttelt.

### LB-Medium

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

Dieser Ansatz wurde autoklaviert. Für festes Medium wurde dem Ansatz noch 1% (w/v) Agar zugesetzt. Zur Selektion wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin beigefügt.

## 2.5 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefen erfolgte, falls nicht anders angegeben, bei 30 °C. Falls es sich um eine Flüssigkultur handelte, wurde diese bei 220 rpm geschüttelt.

### YPD

2% (w/v)	Pepton aus Casein
1% (w/v)	Hefeextrakt
2% (w/v)	Glukose

Falls es sich um ein festes Medium handelte wurde noch 2% (w/v) Agar zugefügt und die Glukose gesondert autoklaviert. Zur Selektion des *natNT2*-Gens wurde 100 µg/ml Nourseothricin zugefügt.

### Minimalmedium

2% (w/v)	Glukose
0,67% (w/v)	Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne Aminosäuren mit Ammoniumsulfat
0,13% (w/v)	drop-out-Mix ohne Adenin, Alanin, Histidin, Leucin, Lysin, Tryptophan und Uracil

<u>Substanz</u>	<u>Menge [mg/l]</u>
Adenin	18
L-Alanin	76
L-Histidin	76
L-Leucin	380
L-Lysin	76
L-Tryptophan	76
L-Uracil	76

Je nach gewünschtem Medium wurden verschiedene Kombinationen aus den oben aufgeführten Aminosäuren beigefügt. Dieser Ansatz wurde bei einem Flüssigmedium sterilfiltriert.

Für ein festes Medium wurde 2% (w/v) Agar in destilliertem Wasser getrennt von der Glukose autoklaviert. Das YNB und die Aminosäuren wurden in destilliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Nachdem der Agar und die Glukose bis auf etwa 60 °C abgekühlt waren wurden die sterilfiltrierten Substanzen zugegeben.

#### Sporulationsmedium

1% (w/v)	KAc
0,1% (w/v)	Hefeextrakt
0,05% (w/v)	Glukose

Es wurden gegebenenfalls benötigte Nährstoffe zugesetzt. Bei festem Medium wurde 2% (w/v) Agar zugesetzt und autoklaviert. Wenn das Sporulationsmedium für den Colony Blot verwendet wurde, wurde nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ungefähr 60 °C 4 µg/ml Cycloheximid zugegeben.

#### FOA-Medium

2% (w/v)	Glukose
0,67% (w/v)	Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne Aminosäuren mit Ammoniumsulfat
0,2% (w/v)	d/o Ura-Mix
50 mg/l	Uracil
0,1% (w/v)	5-FOA

In dem d/o Ura-Mix waren alle Substanzen, die oben unter dem Minimalmedium angegeben sind, gemischt außer Uracil. Dieser Ansatz wurde für 1 l Medium in 200 ml destilliertem

Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst und anschließend sterilfiltriert. Gesondert wurde 2% (w/v) Agar in 800 ml destilliertem Wasser autoklaviert. Nachdem der Agar auf ungefähr 60 °C abgekühlt war, wurden beide Ansätze gemischt.

## 2.6 Langzeitlagerung von Bakterien und Hefen

Um Bakterien und Hefen langfristig zu lagern, wurden jeweils 750 µl einer frischen Übernachtskultur entnommen, 1:1 mit einer 87%igen sterilen Glycerollösung gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kryokulturen wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

## 2.7 Zellzahlbestimmung

### 2.7.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kultur wurde eine Probe mit Hilfe der „improved“ Neubauer Zählkammer untersucht und je vier Eckquadrate ausgezählt. Jedes Eckquadrat fasst ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup>. Daraus ergibt sich dann die Rechnung für die Zellzahl pro Milliliter:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{(\text{Anzahl der in 4 Eckquadraten gezählten Zellen})}{4} \times 10000$$

Falls eine Verdünnung angefertigt wurde, musste diese in dieser Rechnung berücksichtigt werden.

### 2.7.2 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Es wurden Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Als Referenz diente das jeweilige unbeimpfte Medium.

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

10 ml einer Übernachtskultur wurden mit einer Einzelkolonie des gewünschten Hefestammes beimpft. Am nächsten Tag wurden 2 ml entnommen und 5 min bei 2000 x g RT zentrifu-

giert. Das Pellet wurde mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 40 µl „Breaking“-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde eine Spatelspitze Glasperlen hinzugegeben, sowie 40 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Dieser Ansatz wurde nun 2 x 90 sec mit einer Pause von 1 min bei 4 °C im BeadBeater gevortext. Um die Flüssigkeit vom Deckel zu entfernen wurde kurz abzentrifugiert und danach 40 µl 10 x TE-Puffer zugegeben, kurz gevortext und anschließend für 10 min bei 13000 x g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml absolutem 99%igem Ethanol bei -20 °C 1 h lang präzipitiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 x g für 3 min, bei dem die genomische DNA pelletiert wurde. Dieses Pellet wurde einmal mit je 1 ml absolutem 99%igem Ethanol und 70%igem Ethanol gewaschen. Es wurde anschließend in der „Speed-Vac“ 5 min lang getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert und je 5 µl als Template zur PCR eingesetzt.

#### „Breaking“-Puffer

2% (v/v)	Triton X-100
1% (w/v)	SDS
100 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
pH 8,0	

### **2.8.2 Plasmid-Reisolation aus *S. cerevisiae***

Von einer Übernachtskultur wurden 1,5 ml entnommen und 5 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml TE-Puffer wurde das Pellet in 100 µl STET-Lösung resuspendiert und mit Glasperlen 3 x 1 min mit je 1 min Pause bei 4 °C mit dem BeadBeater aufgeschlossen. Anschließend wurden 100 µl STET-Lösung zu dem Ansatz zugegeben und für 10 min bei 95 °C gekocht. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 x g für 10 min bei 4 °C. Nun weiter dem Mini Prep-Protokoll folgend, wurde der Überstand zusammen mit je 250 µl Resuspensionslösung, Lyselösung und Neutralisationslösung auf die Säule gegeben. Alle weiteren Schritte sind wie im Mini Prep-Protokoll beschrieben. Die Elution der DNA erfolgte mit 40 µl sterilem Wasser. Davon wurden 10 µl zur *E. coli*-Transformation (siehe Punkt 2.8.12) eingesetzt.

### STET-Lösung

8% (w/v)	Sucrose
50 mM	Tris-HCl
50 mM	EDTA
5% (v/v)	Triton-X-100
pH 8,0	

### **2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine weit verbreitete und gut etablierte Methode, um DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wurden in dieser Arbeit ausschließlich 1%ige Agarose-Gele verwendet. Hierbei wird die passende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, bis die Flüssigkeit ganz klar ist und keine Schlieren zu erkennen sind. Sobald der Ansatz auf etwa 50-60 °C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid zugefügt (Endkonzentration=0,5 µg/ml). Dieses interkaliert mit der DNA und wird durch UV-Licht angeregt. Die Detektion erfolgte mittels DNA-Dokumentationssystem von PEQLAB.

### TAE-Puffer

40 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
40 mM	Essigsäure
pH 8,0	

### **2.8.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA**

Die Konzentration von DNA wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Deshalb kann die Reinheit der Probe durch den Quotienten der gemessenen Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Ein Wert zwischen 1,8 und 2 lässt auf eine reine Probe schließen.

### **2.8.5 Deletion von Genen der chromosomalen DNA in Hefen**

Die Deletion von Genen im Hefegenom wurde nach Janke et al., 2004 durchgeführt (Janke et al., 2004). Als Template für das Resistenz-Gen wurde das Plasmid pYM-natNT2 verwen-

det, das für eine Resistenz gegen Nourseothricin codiert (Janke et al., 2004). Von diesem Plasmid wurde das Resistenzgen mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden Primer verwendet, die komplementäre Bereiche zu den 5' und 3' Sequenzen des zu deletierenden Gens besitzen. Die Hefezellen wurden mit dem PCR-Produkt transformiert und durch homologe Rekombination wurde das Resistenz-Gen an Stelle des zu-deletierenden Gens eingefügt. Die Selektion erfolgte auf YPD mit 100 µg/ml Nourseothricin. Die Inkubation erfolgte für 3-5 Tage bei 30 °C. Bei schwierigen Deletionen wurde das Protokoll von Wach, Brachat und Philippsen zugezogen und nach diesen Angaben Primer kreiert, die jeweils über etwa 300 bp komplementäre Sequenzen verfügen. Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen homologen Rekombination in den Zielbereich.

### 2.8.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten, die genomisch oder auf einem Plasmid codiert sind. Diese DNA dient also als Template und der zu amplifizierende Bereich wird durch Primer eingegrenzt. In der Regel sind Primer etwa 20 bp lang, haben ein ausgewogenes Verhältnis von Guanin/Cytosin zu Adenin/Thymin, mit einem Guanin oder Cytosin am 3'-Ende. Diese Primer sind komplementär zu Sequenzen auf dem Template, an dem sie durch Basenpaarung binden. Sie dienen so als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Eine PCR gliedert sich in drei Teile, die durch jeweilige Temperatur-Bereiche gekennzeichnet sind. Die Template-DNA wird erst denaturiert, so dass im folgenden Annealing-Schritt die Primer binden können. Im abschließenden Temperaturbereich erfolgt die Extension der Primer durch die DNA-Polymerase. Diese drei Abschnitte werden in der Regel 25-35 Mal wiederholt. Das PCR-Produkt kann anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetragen und/oder zur Restriktion, Ligation oder Transformation verwendet werden. Beispiel für eine PCR für die genomische DNA als Template dient.

Ansatz für 25 µl		Programm <sup>a</sup>	
Template	1 µl	1.	95 °C 7 min
5 x Crimson Buffer	5 µl	2.	95 °C 30 sec
10 µM primer for	1 µl	3.	45-65 °C 30 sec
10 µM primer rev	1 µl	4.	65 °C 50 sec/kb
10 mM dNTPs	0,75 µl	5.	65 °C 7 min
Crimson Long Amp Polymerase	1 µl	<sup>a</sup> 30 Zyklen von Schritt 2 bis 4	
H <sub>2</sub> O ad 25 µl			

### 2.8.7 Error-prone-PCR

Diese besondere Art der PCR wurde verwendet, um willentlich während der Amplifizierung Punktmutationen durch fehlerhafte Synthese des neuen DNA-Strangs mittels DNA-Polymerase zu provozieren. Dies wird durch ein unausgewogenes Verhältnis von Desoxynukleotiden erreicht. Gegebenenfalls kann man zusätzlich Manganchlorid und/oder eine erhöhte Konzentration Magnesiumchlorid zu dem Ansatz geben. Bei beiden Maßnahmen wird die Mutationsrate erhöht. Dabei war das Ziel, ein ausgewogenes Verhältnis der Mutationsraten pro Nukleotid zu erreichen. Hierzu diente ein Protokoll von Cadwell & Joyce, 1992 als Vorlage (Cadwell & Joyce, 1992). Für diesen Versuch war es erforderlich, eine Polymerase ohne Proof-Reading-Funktion zu verwenden. Hier wurde die *Taq* DNA-Polymerase von Thermo Scientific ausgewählt.

<u>Ansatz für 50 µl</u>		<u>Programm<sup>a</sup></u>		
Template	1 µl	1.	95 °C	2 min
10 x EP-Puffer	5 µl	2.	95 °C	30 sec
forward primer	1,25 µl	3.	67 °C	30 sec
reverse primer	1,25 µl	4.	72 °C	3,5 min
10 x dNTP -Mix	5 µl	5.	72 °C	5 min
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	1 µl	<sup>a</sup> 30 Zyklen von Schritt 2 bis 4		
H <sub>2</sub> O ad 50 µl				

<u>10 x dNTP-Mix</u>		<u>10 x EP-Puffer</u>	
2 mM	dGTP	70 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	dATP	500 mM	KCl
10 mM	dCTP	100 mM	Tris-HCl
10 mM	dTTP	0,1% (v/v)	Glycerin
		pH 8,3	

### 2.8.8 Hefe-Transformation mit Elektroporation

Die Hefe-Transformation mittels Elektroporation wurde in dieser Arbeit verwendet, um möglichst effizient viele verschiedene error-prone-Plasmide in KRY875 einzuschleusen, um eine große Anzahl verschiedener Mutanten screenen zu können.

50 ml YPD wurden mit dem zu transformierenden Hefestamm beimpft und bei 30 °C und 220 rpm bis zu einer  $OD_{600}=1,3-1,5$  inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 4000 x g und 4 °C 10 min lang zentrifugiert und in 8 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert. Zur Erhöhung der Kompetenz wurden 1 ml 10 x TE, pH 7,5 und 1 ml 1 M LiAc (siehe Punkt 2.8.9) zugegeben und vorsichtig bei 30 °C und 90 rpm 45 min geschüttelt. Danach wurden 250 µl 1 M DTT zugefügt und für weitere 15 min inkubiert.

Es folgte das Aufkonzentrieren der Zellen. Dazu wurden erst 40 ml eiskaltes steriles Wasser zu dem Pellet zugegeben und bei 4 °C und 4000 x g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde mit 25 ml eiskaltem sterilem Wasser und mit 2,5 ml 1 M eiskaltem Sorbitol gewaschen, wobei die Zentrifugationsbedingungen beibehalten wurden. Zum Schluss wurde das Pellet in 50 µl eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert. Das Endvolumen sollte zwischen 100 und 150 µl liegen.

Zur Elektroporation wurden 40 µl davon in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben und weniger als 100 ng DNA mit einem Volumen kleiner als 5 µl zugefügt. Die Küvette wurde bis zu dem Puls und direkt danach auf Eis aufbewahrt. Zur Elektroporation wurde der Pulser von BioRad verwendet: Programm fungi> Sc2, 1 kv, 25 F 600. Bei einer Zeit von 5,7 msec war der Puls erfolgreich. Direkt nach dem Puls wurden 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zugegeben und die Suspension in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Es wurde 500 µl YPD zugegeben und unter Schütteln bei 30 °C 1 h lang inkubiert. Anschließend wurde bei 3000 x g 3 min abzentrifugiert, das Pellet in 200 µl 1 M Sorbitol resuspendiert und jeweils 100 µl auf eine Selektionsplatte mit 1 M Sorbitol ausplattiert.

### **2.8.9 Hefe-Transformation mit Lithiumacetat**

Die Methode der Hefe-Transformation basiert auf der Beobachtung, dass Hefen durch Zugabe von Lithiumacetat leichter DNA aufnehmen und somit die Effizienz von Transformationen erhöht wird (Ito et al., 1983; Schiestl & Gietz, 1989). Wie genau dies geschieht ist jedoch unklar.

Für die Transformation einer Hefekultur wurden 10 ml YPD mit einer Einzelkolonie des zu transformierenden Hefestammes beimpft. Von dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 2 ml entnommen, 5 min bei 2000 x g RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgte ein Waschschrift bei gleichen Zentrifugationsbedingungen in 1 ml LiAc/TE-Puffer und eine Resuspension in 100 µl LiAc/TE-Puffer. Dazu wurden 20 µl sogenannter Carrier-DNA hinzugegeben, wobei es sich um hitzedenaturierte Lachssperma-DNA mit einer Stock-Konzentration von 10 mg/ml handelte. Zusätzlich wurden noch 200 ng des zu transformierenden Plasmids bzw. PCR-Produkts und 600 µl PEG-Lösung zugegeben.

Desweiteren wurden 50 µl 10 x LiAc zugefügt und der Ansatz 1 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit lagert sich die Plasmid-DNA oder das PCR-Produkt an die Hefen an. Der Hitzeschock erfolgte für 15 min bei 42 °C, davor wurde bei schwierigen Transformationen 20 µl DMSO zugegeben. Falls die Zellen eine Antibiotika-Resistenz ausbilden mussten, wurden sie danach einmal mit 500 µl 1xTE gewaschen und in YPD aufgenommen, um sie 6-8 h bei 30 °C unter Schütteln zu inkubieren. Falls die Zellen über d/o Medium selektioniert wurden, war diese Inkubation nicht nötig. Die Zellen wurden zweimal mit je 500 µl 1 x TE gewaschen und auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert, wo sie 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

<u>10 x LiAc</u>		<u>LiAc/TE-Lösung</u>	
1M	LiAc	10%	10 x LiAc pH 7,5
pH 7,5		10%	10 x TE
(mit Essigsäure einstellen)		80%	H <sub>2</sub> O dest.

<u>10 x TE</u>		<u>PEG-Lösung</u>	
100 mM	Tris-HCl	10%	10 x LiAc pH 7,5
10 mM	EDTA	10%	10 x TE
pH 7,5		80%	PEG4000 (50%ig)
(mit HCl einstellen)			

<u>50% PEG4000</u>	
50% (w/v)	PEG-4000

### 2.8.10 Plasmid-shuffle mittels FOA-Selektion

Diese Methode wird verwendet, um durch positive Selektion den Verlust eines Plasmids, das ein *URA3*-Marker-Gen trägt, zu Gunsten eines anderen Plasmids zu provozieren (Boeke et al., 1987). Dies geschieht über einen Zwischenschritt, bei dem beide Plasmide durch Transformation in die Hefezellen eingebracht worden sind. Das *URA3*-Gen codiert für die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, die die 5' Fluoroorotische Säure (FOA) zu Fluorouracil umwandelt, das toxisch wirkt (Boeke et al., 1987). Die Hefen werden zur Selektion 3-5 Tagen bei 30 °C inkubiert.

### 2.8.11 Kompetente *E. coli*-Zellen

*E. coli*-Zellen besitzen keine natürliche Kompetenz, DNA-Moleküle aufzunehmen. Diese kann ihnen aber durch Behandlung mit zweiwertigen Kationen verliehen werden, wie erstmals in Mandel, 1970 gezeigt wurde (Mandel, 1970). Am effizientesten haben sich hier Calcium-Ionen erwiesen (Mandel, 1970). Wie der genaue Mechanismus funktioniert, ist jedoch noch nicht bekannt.

Um kompetente *E. coli*-Zellen herzustellen, wurde folgendes Protokoll verwendet: 10 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  beimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Übernachtskultur in 25 ml LB-Medium überimpft und etwa 2 h bei 37 °C, 220 rpm inkubiert bis die Kultur eine OD<sub>600</sub>=0,5-0,7 erreicht hatte. Diese wurde anschließend bei 4500 x g, 4 °C für 6 min abzentrifugiert, Überstand verworfen und das Pellet auf Eis gelagert. Mit 8,5 ml TFP1 wurde das Pellet resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4500 x g, 4 °C für 6 min wurde das Pellet vorsichtig in 1 ml TFP2 resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und à 100  $\mu$ l aliquotiert. Diese Aliquots wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>TFP1</u>		<u>TFP2</u>	
33 mM	KAc	10 mM	MOPS
100 mM	KCl	10 mM	KCl
10 mM	CaCl <sub>2</sub>	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10% (v/v)	Glycerol	10% (v/v)	Glycerol
50 mM	MnCl <sub>2</sub>		
pH 5,8		pH 6,5	

### 2.8.12 Bakterien-Transformation

100 ng eines Plasmids bzw. 10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes wurden zu 100  $\mu$ l kompetenten DH5 $\alpha$ -Bakterienzellen zugegeben. Dieser Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min, dem eine 5-minütige Inkubation auf Eis folgte. Nach dem Zufügen von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde er für 1 min 10000 x g abzentrifugiert, in 200  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und auf vorgewärmten LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum, entsprechend der durch das Plasmid vermittelten Resistenz, ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.8.13 TOPO-Klonierung

Bei der TOPO-Klonierung macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die meisten erhältlichen DNA-Polymerasen bei der Amplifikation von PCR-Produkten ein überhängendes Adenosin am 3'-Ende zufügen. Dieses Adenosin ist komplementär zu dem überhängenden Thymidin an den Enden des TOPO-Vektors. Diese Thymidine sind an das Tyrosin 274 des Topoisomerase I Enzyms des *Vaccinia*-Virus gebunden. Diese Bindung wird durch die Insertion des PCR-Produkts aufgelöst und eine Phosphodiesterbindung zwischen Vektor und Insert gebildet.

In dieser Arbeit wurde das TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit von Invitrogen mit dem pCR<sup>™</sup> II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor verwendet. Die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Ligation wurde der Ansatz zur *E. coli*-Transformation eingesetzt und die Kolonien auf positive Insertion des PCR-Produktes durch ein Blau-Weiß-Screening getestet. Dazu wurden den LB-Amp-Platten 40 µl einer X-Gal-Stocklösung pro Platte mit einem Drigalski-Spatel einmassiert. Durch die Insertion des PCR-Produkts wird das *LacZ*-Gen des TOPO-Vektors inaktiv und kann X-Gal nicht in einen blauen Farbstoff umwandeln. Zur weiteren Analyse wurden weiße Kolonien zur Mini-Prep eingesetzt und sequenziert (siehe Punkt 2.8.14 und Punkt 2.8.17).

#### X-Gal-Stocklösung

40 mg/ml                      X-Gal in DMSO

### 2.8.14 Plasmid-Präparation

Zur Präparation eines Plasmids aus einer *E. coli*-Kultur wurden entweder das Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two-Kit von Stratec für 2 ml-Kulturen oder das GenElute<sup>™</sup> HP Plasmid Maxiprep Kit von Sigma für 150 ml Kulturen verwendet. Beide Kits basieren auf dem gleichen Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Neutralisation, wodurch die genomische DNA sowie Proteine ausfallen und die Plasmid-DNA im Überstand erhalten bleibt. Diese wird anschließend auf einer Silica-Membran gebunden. Durch Waschschrte werden Verunreinigungen entfernt und die Elution erfolgt durch Nidrigsalz-Puffer oder steriles Wasser. Die Plasmid-DNA kann nun für eine anschließende Transformation, Sequenzierung oder Restriktion eingesetzt werden.

### **2.8.15 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen**

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion und Auftrennung im Agarose-Gel wurde das Gen Elute™ Gel Extraction Kit von Sigma verwendet. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Im Prinzip wurden die Agarose-Stücke solubilisiert und die DNA auf einer Silicamembran in einem Röhrchen gebunden, gewaschen und mit sterilem Wasser eluiert. Diese Methode eignet sich für linearisierte DNA-Fragmente im Bereich von 50 bp bis zu 10 kb. Anschließend kann die DNA zur Sequenzierung, PCR, Restriktionsverdau oder Klonierung verwendet werden.

### **2.8.16 DNA-Ligation**

Für die Ligation eines Vektors und eines DNA-Fragmentes wurde die T4-Ligase von Fermentas verwendet. Die Ligase bildet unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiester-Bindung aus einer freien 5'Phosphatgruppe und einer 3'Hydroxylgruppe zweier linearisierter DNA-Fragmente. Durch Berücksichtigung der Komplementation der jeweiligen Basen am Ende der DNA-Fragmente wurde so ein geschlossenes Plasmid erzeugt.

In dieser Arbeit wurden zu 20 ng eines Vektors, die 3 bis 5fache Menge des Inserts und jeweils 5 u der T4-Ligase zugegeben. Bei der Ligation wurde ansonsten nach Herstellerangaben gearbeitet. Der Ansatz wurde für 1 h bei 20 °C inkubiert und 10 µl davon für die *E. coli*-Transformation eingesetzt (siehe Punkt 2.8.12). Die erfolgreiche Ligation wurde nach der Mini-Prep mehrerer *E. coli*-Kolonien mittels charakteristischer Restriktion und anschließender Auftrennung auf einem 1%igem Agarose-Gel überprüft.

### **2.8.17 DNA-Sequenzierung**

Zur Identifizierung von Mutationen in isolierten Plasmiden wurde eine Sequenzierung nach Sanger et al., 1977 von der Firma LGC Genomics durchgeführt (Sanger et al., 1977). Zur Analyse der Sequenzierungs-Daten wurde das Programm 4peaks verwendet.

### **2.8.18 Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS)**

Bei der Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS) werden durch die Alkylierung von Guanin zu O6-Ethylguanin zufällig Punktmutationen eingefügt (Greene et al., 2003). Während der Replikation wird oft ein Thymin komplementär zu O6-Ethylguanin in die DNA eingebaut (Greene et al., 2003). Deshalb wird meistens G/C zu A/T mutiert (Greene et al., 2003).

Für die Mutagenese mit EMS wurde eine 20 ml-Kultur unter Schütteln bei 30 °C über Nacht bis zu einer Zellzahl von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml inkubiert. Anschließend wurden zweimal 1 ml bei  $5000 \times g$  für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml destilliertem Wasser gewaschen und in 1 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde daraufhin noch einmal exakt bestimmt, 30  $\mu$ l EMS zu einem der beiden Reagiergefäße zugegeben und gevortext. Die Kulturen wurden 1 h lang bei 30 °C geschüttelt und, wie oben beschrieben, abzentrifugiert. Der giftige Überstand muss speziell entsorgt werden. Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l 5% Natriumthiosulfat resuspendiert, was das EMS inaktiviert. Der Ansatz wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 2  $\times$  in 200  $\mu$ l Natriumthiosulfat gewaschen. Die Zellen wurden in sterilem Wasser resuspendiert und zu 500  $\mu$ l, 200  $\mu$ l und 100  $\mu$ l ausplattiert.

Natriumthiosulfat-Lösung

5% (w/v)       $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Natriumphosphat-Puffer

0,1 M       $\text{NaHPO}_4$

### 2.8.19 *sec63*-Mutanten-Screen

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand darin, einen Screen nach neuen *sec63*-Mutanten durchzuführen, die einen ERAD-Defekt aufweisen. Da es sich bei *SEC63* um ein essentielles Gen handelt, musste zuerst ein Stamm kreiert werden, der das *wtSEC63*-Gen trägt, welches aber leicht durch ein mutiertes *sec63*-Gen auszutauschen ist, um nur die Effekte von möglichen Mutanten zu eluieren.

Hierzu wurden als erstes die haploiden Stämme W303-1C und W303-1A gekreuzt (siehe Abb. 2.1). W303-1C trägt das *prc1-1*-Allel, das für das ERAD-Substrat CPY\* codiert, das später als Indikator für einen möglichen ERAD-Defekt dienen sollte. Der daraus resultierende diploide Stamm wurde mit einem *wtSEC63-URA3*-Plasmid, mittels LiAc-Transformation transformiert (siehe Punkt 2.8.9). Anschließend wurde durch homologe Rekombination mit *natNT2*, das eine Resistenz gegen Nourseothricin vermittelt, eines der beiden genomischen *SEC63*-Gene deletiert. Diese Diploide wurde nun in Sporulationsmedium überführt (siehe Abb. 2.2). Nach etwa 3 Tagen wurden Tetraden vereinzelt und sobald diese haploiden Tochterstämme angewachsen waren, wurden sie durch Überführung auf Selektionsmedium auf Deletion des genomischen *SEC63*-Gens und auf Vorhandensein des *SEC63-URA3*-Plasmids geprüft (siehe Punkt 2.10.4). Beide Eigenschaften und auch die Haploidie wurden durch eine PCR zusätzlich verifiziert. Das *prc1-1*-Allel ist jedoch durch kein Markergen

gekennzeichnet und das Vorhandensein musste mittels Pulse-Chase getestet werden (siehe Punkt 2.9.10).

Nachdem der Stamm, der alle diese Eigenschaften vereinte, identifiziert worden war, konnte er mit error-prone *sec63-LEU2*-Plasmiden transformiert werden (siehe Punkt 2.8.8). Die transformierten Kolonien wurden auf FOA-Platten überführt, wobei durch positive Selektion das *wtSEC63-URA3*-Plasmid ausgeschleust wurde (siehe Punkt 2.8.10). Die erhaltenen möglichen Mutanten wurden anschließend mittels Colony Blot (siehe Punkt 2.10.5) auf einen ERAD-Defekt bei CPY\* getestet.

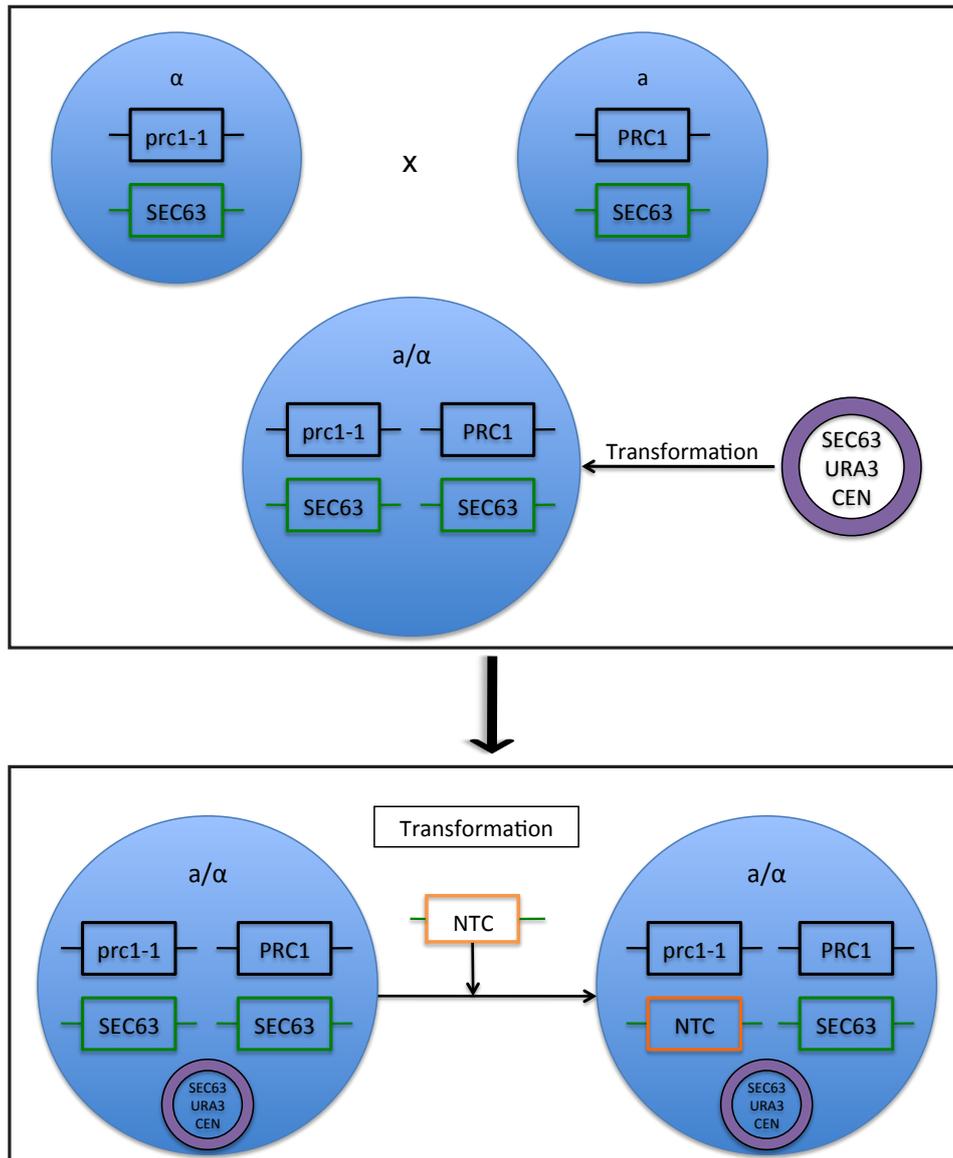


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des *sec63*-Mutanten-Screens (Teil 1)

Die Hefezellen sind durch blaue gefüllte Kreise dargestellt. Der Genotyp betreffend *SEC63*-Gen, *PRC1/prc1-1*-Allel und „mating type“ ist angegeben. Die genomisch codierten Gene sind durch ein Rechteck, dargestellt, die Plasmide durch Kreise. *URA3*-Plasmide sind violett gefärbt. Das obere Bild zeigt, die Kreuzung des Stämme W303-1A und W303-1C mit anschließender Transformation durch das *SEC63-URA3*-Plasmid. Das untere Bild zeigt die Deletion eines der genomischen *SEC63*-Gene in der Diploide durch homologe Rekombination durch das *natNT2*-Gen (*NTC*).

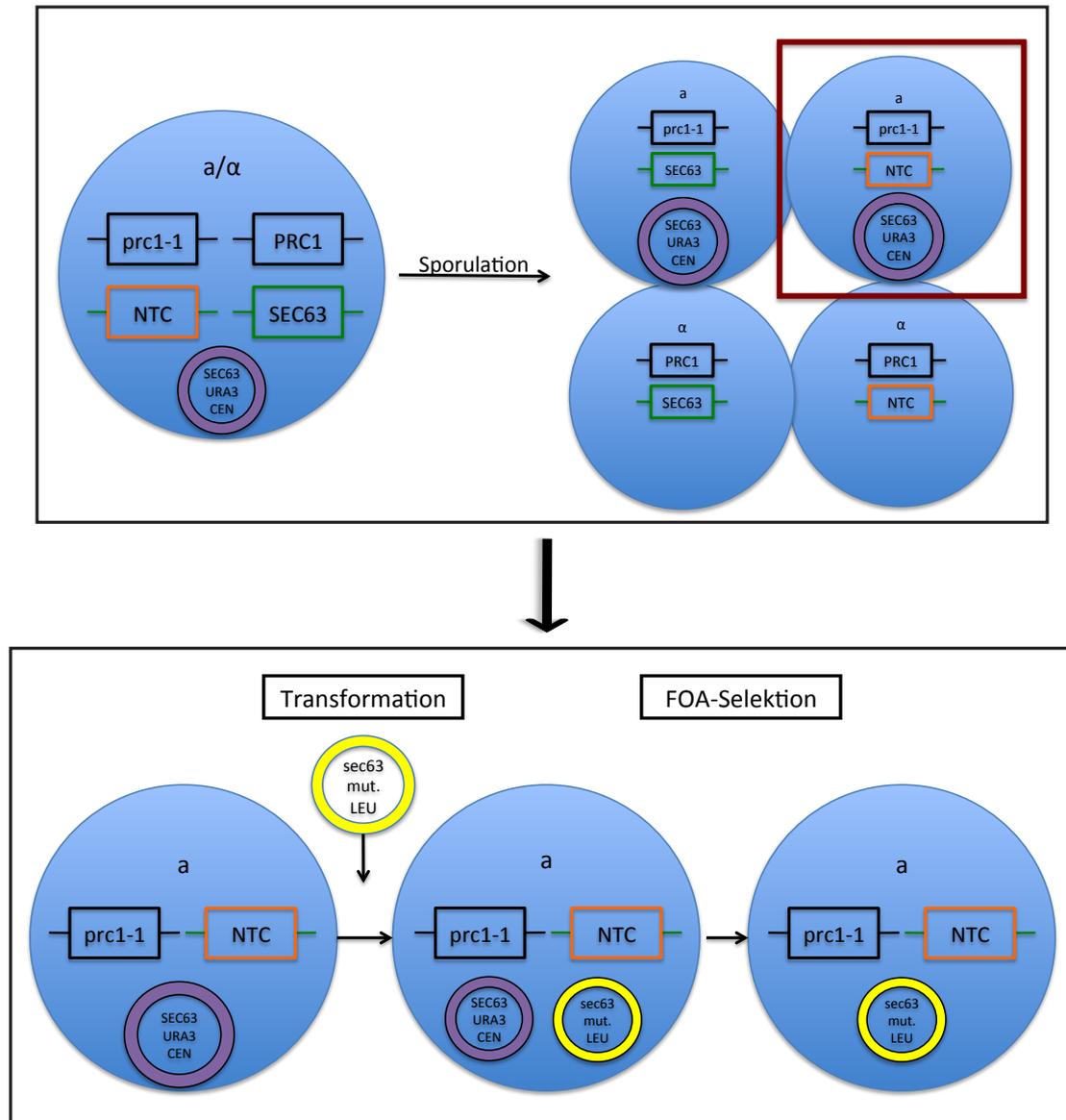


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus des *sec63*-Mutanten-Screens (Teil 2)

Die Hefezellen sind durch blaue gefüllte Kreise dargestellt. Der Genotyp betreffend *SEC63*-Gen, *PRC1/prc1-1*-Allel und „mating type“ ist angegeben. Die genomisch codierten Gene sind durch ein Rechteck, dargestellt, die Plasmide durch Kreise. *URA3*-Plasmide sind violett gefärbt, *LEU2*-Marker-Plasmide gelb. Das obere Bild zeigt die Isolation des gesuchten haploiden Stammes (roter Rahmen). Das untere Bild zeigt den Plasmid-shuffle des *SEC63-URA3*-Plasmids durch das „error-prone“ *sec63-LEU2*-Plasmid.

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

### 2.9.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* wurden 2 ml  $OD_{600}=2$  bei  $2000 \times g$  für 5 min abzentrifugiert und mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 150  $\mu$ l SDS-Probenpuffer (siehe Punkt 2.9.2) inklusive  $1/5$  1 M DTT aufgenommen und mit einer Spatelspitze Glasperlen versetzt (siehe Punkt 2.9.2). Der Aufschluss erfolgte im BeadBeater für  $3 \times 1$  min mit je 1 min Pause bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Probe wurde im Folgenden für 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt und für 5 min bei  $13000 \times g$  abzentrifugiert um die nichtlöslichen Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte anschließend für eine SDS-PAGE verwendet werden oder bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

### 2.9.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend zum Western Blot oder zur Coomassie-Färbung eingesetzt (siehe Punkt 2.9.3 und Punkt 2.9.5).

Die Proteinproben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  gekocht, wodurch die Proteine denaturiert wurden. Anschließend wurden sie auf das Gel aufgetragen zusammen mit 6  $\mu$ l von dem gefärbten Größenmarker „PageRuler Prestained Protein Ladder“. Das Gel setzte sich zusammen aus einem 5%igen Sammelgel und einem Trenngel, dessen Rotiphorese 30-Anteil 7,5%, 10% oder 12,5% betrug. Die Elektrophorese erfolgte in  $1 \times$  SDS-Laufpuffer bei 80 V und, nachdem die Proteine in das Sammelgel eingelaufen waren, bei 100 V. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Die angegebenen Rezepte entsprechen der Menge für 2 Gele.

Sammelgel	5%
250 mM Tris-HCl, pH 6,8	3 ml
2% SDS	200 $\mu$ l
Rotiphorese 30	1 ml
H <sub>2</sub> O dest.	1,6 ml
10% APS	60 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l

Trenngel	7,5%	10%	12,5%
750 mM Tris-HCl pH 8,8	10 ml	10 ml	10 ml
10% SDS	200 µl	200 µl	200 µl
Rotiphorese 30	5 ml	6,6 ml	8,3 ml
H <sub>2</sub> O dest.	4,5 ml	2,8 ml	1,2 ml
10% APS	280 µl	280 µl	280 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl

4 x SDS-Laufpuffer

200 mM Tris-HCl  
 1,5 M Glycin  
 0,4% (w/v) SDS  
 pH 8,3

2 x SDS-Probenpuffer

100 mM Tris-HCl  
 4% (w/v) SDS  
 20% (v/v) Glycerol  
 1 Spatelspitze Bromphenolblau  
 200 mM DTT (frisch zugeben)  
 pH 6,8

### 2.9.3 Western Blot

Der Western Blot dient dazu, Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, die anschließend zur Immundetektion mittels Antikörper eingesetzt wird.

In dieser Arbeit wurde der sogenannte „Nassblot“ verwendet. Dazu wurden in einer Western Blot-Kassette ein SDS-PAGE-Gel mit einer Nitrocellulosemembran eingespannt. Zu beiden Seiten dieses „Sandwiches“ wurden Filterpapiere und Schwämme gelegt. Die Schwämme, Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran wurden vor Zusammenbau in Transferpuffer getränkt. Abschließend wurde mit einem Glasstab über das „Sandwich“ gerollt, um mögliche Luftblasen zu entfernen. Die Kassette wurde anschließend in eine Blot-Kammer gestellt, die mit 3 l Transferpuffer befüllt war, so dass die Nitrocellulosemembran der Anode zugewandt war und das Gel der Kathode, da die durch SDS negativ-geladenen Proteine in dem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Transferreaktion fand für 1,5 h bei 400 mA unter Kühlung mit einer Kühlschleife statt.

Transferpuffer

25 mM	Tris-HCl
200 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
0,02% (w/v)	SDS

### 2.9.4 Immundetektion

Bei der Immundetektion werden an einer PVDF- oder Nitrocellulosemembran gebundene Proteine von einem primären mono- oder polyklonalen Antikörper erkannt. An deren artspezifische Fc-Regionen binden anschließend sekundäre Antikörper, an die ein Enzym gekoppelt ist, das durch Umsetzung eines speziellen Substrats eine Farb- oder Lichtreaktion hervorruft.

Um mögliche unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu minimieren, wurden die Membranen 1 h bei RT in Blotto unter Schütteln geblockt. Erst anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper entweder bei RT für 2 h oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde 2 x 10 min mit Blotto und 2 x 10 min mit TBST gewaschen und anschließend 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Darauffolgend wurde 6 x 5 min mit TBST gewaschen und die Membran zur Detektion mit ECL eingesetzt. Hierzu wurde 1-2 ml einer 1:1 Mischung beider ECL-Chemikalien etwa 1 min auf die Membran geben. Die Detektion des emittierten Lichts erfolgt durch Röntgenfilm.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich sekundäre Antikörper verwendet, die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren. Diese Peroxidase oxidiert das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol, wodurch es zu einer Emission von Licht kommt, was zur Schwärzung eines Röntgenfilms führt. Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in der Entwicklermaschine von AGFA oder in dem Dokumentationssystem von Biorad.

Blotto

50 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
2% (w/v)	Milchpulver
0,1% (v/v)	Tween 20
5 mM	NaN <sub>3</sub>
pH 7,4	

TBST

20 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
0,1% (v/v)	Tween 20
pH 7,5	

### 2.9.5 Coomassie-Färbung

Zum unspezifischen Anfärben von Proteinen in einem SDS-Acrylamid-Gel wurde Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung verwendet. Für eine schnelle Färbung des Proteingels wurde die Lösung 3 x 20 sec bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt mit jeweils 20 sec Pause dazwischen. Anschließend wurde die Färbelösung mit einer Fixierlösung ausgewaschen, die über mehrere Stunden mehrmals gewechselt wurde.

<u>Färbelösung</u>		<u>Fixierlösung</u>	
1 g	Coomassie Brilliant Blue R-250	11%	Essigsäure
		33%	Methanol
	Fixierlösung ad 100 ml		H <sub>2</sub> O ad 1 l

### 2.9.6 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Assay nach Pierce verwendet. Dieser Assay ist eine abgewandelte Form der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951). Er basiert auf der Detektion von Cu<sup>+</sup>-Kationen, die bei der Reaktion von Cu<sup>2+</sup> mit Proteinen in einem alkalischen Milieu entstehen. Diese Reaktion wird verstärkt durch die Reaktion von Bicinchoninsäure (BCA) mit den reduzierten Cu<sup>+</sup>-Ionen. Jeweils zwei BCA-Moleküle bilden einen Komplex mit einem Cu<sup>+</sup>-Ion, der violett erscheint. Durch diese Reaktion wird ein farbiger wasserlöslicher Komplex gebildet, der im Photometer bei 562 nm gemessen werden kann. Die Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan können die Reaktion zur Farbbildung beeinflussen.

Als Proteinkonzentrations-Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA angefertigt, wobei 2 mg/ml die höchste Konzentration darstellte. Mit den gemessenen Absorptionen wurde eine Eichkurve ermittelt, die als Referenz zur Ermittlung der Proteinkonzentration diente. Zur Messung wurden je 25 µl der Probe mit 200 µl des „working reagent“ in einer 96-well-Platte versetzt und in einem „Microplate Reader“ bei 37 °C durchgeführt.

#### „working reagent“

- 98% BCA-Lösung
- 2% CuSO<sub>4</sub>-Lösung (4%)

### 2.9.7 Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (His-Trap)

Bei dieser Methode wird die Bindung von Histidin an Nickel genutzt. Die Chromatographiesäulen bestehen aus Agarose-Perlen mit gebundenem Chelator, an den wiederum zweiwertige Nickel-Ionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ) gebunden sind. An dieses  $\text{Ni}^{2+}$  binden Proteine, die einen His-Tag tragen, der meist aus sechs Histidinen besteht. Es wurden hierzu 5 ml HiTrap FF Crude-Säulen verwendet. Um die gebundenen Proteine von der Säule zu eluieren, wurde die Säule mit einem Imidazol-haltigen Puffer gewaschen. Bei Imidazol handelt es sich um ein Analogon zu Histidin, wodurch die gebundenen Proteine kompetitiv von  $\text{Ni}^{2+}$  verdrängt werden. Zur Anreicherung wurde der Äkta Purifier verwendet.

### 2.9.8 Aufreinigung von CPY

Ein Proteinfragment von CPY wurde nach Protokoll von Colin Stirling aufgereinigt und zur Antikörper-Herstellung verwendet. Für die Bakterienanzucht wurden 50  $\mu\text{l}$  des kompetenten *E. coli*-Stammes BL21(DE3) Gold mit dem Plasmid pMR17 transformiert und 50  $\mu\text{l}$  davon auf einer LB-Platte mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carbenicillin ausplattiert. Nach etwa 9 h wurden 100 ml einer LB-Kultur mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Carbenicillin mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert und in 100 ml LB-Medium aufgenommen. Mit jeweils 5 ml dieser Kultur wurden je 8 x 250 ml Medium beimpft und bei 37 °C inkubiert.

Bei einer  $\text{OD}_{600}=0,6$  wurden die Kulturen mit jeweils 1 mM IPTG Endkonzentration bei 20 °C unter Schütteln induziert und nach 4 h durch Zentrifugation bei 3500 x g für 20 min bei 4 °C geerntet. Nach diesem Schritt wurde das Nassgewicht notiert und die Pellets konnten bei -20 °C gelagert werden. Die Pellets wurden auf Eis aufgetaut und mit 20 ml PBS gewaschen, wobei die Zentrifugation bei 3500 x g für 7 min und 4 °C erfolgte. Die Pellets wurden daraufhin in 5 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Nassgewicht resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall bei 30 Microns 6 x 30 sec mit 1 min Pause auf Eis. Der Ansatz wurde darauffolgend bei 10000 x g für 20 min 10 °C abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml Bindepuffer aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur invertiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 15000 x g bei 10 °C. Bei kälteren Temperaturen bestand die Gefahr, dass der Harnstoff, der in dem Puffer enthalten ist, ausfällt. Der Überstand wurde durch Anreicherung auf die 5 ml HiTrap FF Crude-Säulen aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer. Die gesammelten Fraktionen wurden zur Überprüfung mit einem SDS-Acrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt (siehe Punkt 2.9.2 und Punkt 2.9.5). Um das aufgereinigte Protein zur Antikörpergewinnung einzusetzen, muss-

te der Harnstoff entfernt werden und eine Umpufferung in PBS stattfinden. Dazu wurden Ultrafiltrationsröhrchen verwendet.

<u>Aufschlusspuffer</u>		<u>Bindepuffer</u>	
50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 M	Urea
300 mM	NaCl	0,1 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 8,0		0,01 M	Tris-HCl
frisch zugegeben:		30 mM	Imidazol
1 mM	PMSF	pH 8,0	
1 mg/ml	Lysozym		

<u>PBS</u>		<u>Elutionspuffer</u>
8 g	NaCl	Bindepuffer mit 500 mM Imidazol
0,2 g	KCl	
1,44 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
0,24 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
pH 7,4		
H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l		

### 2.9.9 Aufreinigung des ppα-Faktors

Der His-getaggte ppα-Faktor wurde nach Bush et al., 1991 aufgereinigt (Bush et al., 1991). Zur Expression wurde das Plasmid pMAH verwendet, bei dem ein Hitzeschock-Promotor vor die Sequenz des ppα-Faktors geschaltet ist (Bush et al., 1991). Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 30 °C und 220 rpm. Mit dieser Übernachtskultur wurde eine 1 l-LB-Amp-Kultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,6 bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 4 h lang bei 42 °C inkubiert. Die Kultur wurde mit 4000 × g für 10 min bei RT abzentrifugiert. Nach diesem Schritt konnte das Pellet bei -20 °C gelagert werden.

Zur Aufreinigung wurde das Pellet etwa 15 min bei RT aufgetaut und in 10 ml Puffer A pro 100 ml Zellkultur resuspendiert und 1 h unter ständigem Invertieren im Drehrad lysiert. Das Lysat wurde bei 10000 × g 10 min lang abzentrifugiert und der Überstand auf eine 5 ml HiTrap FF Crude-Säule aufgetragen, die in Puffer A äquilibriert war. Es folgten Waschschrirte mit jeweils 10 ml Puffer B, C und D. Die Elution des Proteins erfolgte in Puffer B mit 0,25

M Imidazol. Die Säule wurde anschließend mit Puffer B und 0,5 M Imidazol und zum Schluss mit Puffer F gewaschen, um alle Proteine von der Säule zu entfernen.

Puffer A

6 M Guanidin-HCl  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 8,0

Puffer B

8 M Urea  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 M Tris-HCl  
pH 8,0

Puffer C

8 M Urea  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 M Tris-HCl  
pH 6,3

Puffer D

8 M Urea  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 M Tris-HCl  
pH 5,9

Puffer F

6 M Guanidin-HCl  
0,2 M NaN<sub>3</sub>

### 2.9.10 Pulse-Chase und Immunpräzipitation

Bei dem Express [35S]-Protein Labeling Mix handelte es sich um ein Gemisch mit 35S-markiertem Methionin und Cystein. Dieses wurde während dem Pulse in die neu-translatierten Proteine eingebaut und durch eine nachfolgende Zugabe eines Überschusses von unmarkiertem Methionin und Cystein während des Chase wieder stark verdünnt. Somit hat man einen bestimmten Pool von Proteinen, die radioaktiv markiert sind. Dadurch ist es möglich den Abbau eines bestimmten mutierten oder wt-Proteins in mutierten oder wt-Hefestämmen untersuchen.

Für einen Pulse-Chase wurden 25 ml Wachstumsmedium mit einer Einzelkolonie des gewünschten Hefestammes angeimpft. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub>=1 erreicht hat, wurde sie 5 min bei 4500 × g geerntet und zweimal in 10 ml Labeling-Medium gewaschen. Die Kultur wurde anschließend mit Labeling-Medium auf 4 OD<sub>600</sub>/ml eingestellt und in Aliquots à 250 µl

aufgeteilt. Die Reaktionsgefäße wurden mit offenem Deckel bei 30 °C im Thermomixer unter Schütteln etwa 20 min inkubiert. In dieser Zeit sollen die Hefestämme alles zu Verfügung stehende Methionin und Cystein weitgehend verbrauchen. Es folgte der Pulse bzw. das Labeling des Substrats. Dabei wurden zu jedem Aliquot 50 µCi Express [35S]-Protein Labeling-Mix (Perkin Elmer) zugegeben und 2-5 min lang unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Bei dem Chase wurde 250 µl 2 x Chase-Mix zu jedem Aliquot zugegeben. Die Inkubationszeit beim Hungern, beim Labeling, sowie beim Chase war abhängig von der  $t_{1/2}$  des zu markierenden Substrats.

Der Chase wurde durch Zugabe von 750 µl eiskaltem Tris-Azid nach verschiedenen Zeiten gestoppt. Die Aliquots wurden 1 min bei 10000 x g abzentrifugiert und die Pellets wurden 1 x mit 1 ml eiskaltem Tris-Azid gewaschen. Nach einem 10 minütigen Inkubationsschritt in 1 ml Resuspensionspuffer bei RT wurden die Pellets in 150 µl Lysepuffer aufgenommen und mit einer Spatelspitze Glasperlen im BeadBeater 3 x 1 min mit 1 min Pause bei 4 °C aufgeschlossen. Die Ansätze wurden danach bei 95 °C 5 min gekocht und die Glasbeads 3 x mit 250 µl IP-Puffer ohne SDS gewaschen. Die Überstände wurden in neuen Reaktionsgefäßen gesammelt und zur Immunpräzipitation eingesetzt. Um unspezifisch an die Sepharose bindende Zellbestandteile abzufangen, wurden während des Preclearing 60 µl Protein-A-Sepharose zu dem Überstand gegeben und dieser 30 min bei RT auf dem Drehrad invertiert. Der Ansatz wurde 1 min bei 10000 x g abzentrifugiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. 60 µl Protein-A-Sepharose, 1 ml IP-Puffer und 3-10 µl Antikörper (abhängig vom verwendeten Antikörper) wurden zugefügt und entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Der Ansatz wurde 45 sec bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand entweder bei -80 °C aufbewahrt um später wieder gefällt zu werden oder verworfen. Das Pellet wurde jeweils 2 x mit 1 ml IP-Puffer, 1 x 1 ml Urea Wash, 1 x 1 ml ConA Wash und 1 x 1 ml Tris-NaCl-Wash gewaschen. Um die Proteine von der Sepharose zu lösen, wurde das Pellet mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT 5 min bei 95 °C gekocht. Dieser Ansatz wurde neben 1,5 µl eines radioaktiven <sup>14</sup>C-Markers als Größenstandard zur SDS-PAGE eingesetzt.

Das Gel wurde zur Fixierung der Proteine erst 15 min unter Schütteln bei RT mit Fixierlösung 1 und danach 30 min mit Fixierlösung 2 gespült. Das Gel wurde im Gelrockner bei 60 °C etwa 50 min getrocknet. Die radioaktive Strahlung wurde durch Auflegen einer Phosphorplatte und deren anschließendes Scannen im Phosphorimager detektiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageQuantTL.

Minimalmedium

6,7 g/l	YNB mit Aminosäuren und mit Ammoniumsulfat
0,2%	Casaminoacids
5%	Glucose

Labeling-Medium

6,7 g/l	YNB ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat
5%	Glucose
	Auxotrophie-Asen

10 x Chase-Mix

0,3% (w/v)	Cystein
0,4% (w/v)	Methionin
100 mM	Ammoniumsulfat

Tris-Azid

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
20 mM	NaN <sub>3</sub> (frisch zugeben)

Resuspensionspuffer

100 mM	Tris-HCl pH 9,4
10 mM	DTT (frisch zugeben)
20 mM	NaN <sub>3</sub> (frisch zugeben)

Lysepuffer

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
2% (w/v)	SDS
1 mM	DTT (frisch zugeben)
1 mM	PMSF (frisch zugeben)

IP-Puffer ohne SDS

150 mM	NaCl
1% (v/v)	Triton X-100
15 mM	Tris-HCl pH 7,5
2 mM	NaN <sub>3</sub>
1 mM	PMSF (frisch zugegeben)

IP-Puffer

150 mM	NaCl
1% (v/v)	Triton X-100
0,1% (w/v)	SDS
15 mM	Tris-HCl pH 7,5
2 mM	NaN <sub>3</sub>

Urea-Wash

200 mM	NaCl
2 M	Urea
1% (v/v)	Triton X-100
100 mM	Tris-HCl pH 7,5
2 mM	NaN <sub>3</sub>

ConA-Wash

500 mM	NaCl
1% (v/v)	TritonX-100
20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
2 mM	NaN <sub>3</sub>

Tris-NaCl-Wash

50 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl pH 7,5
2 mM	NaN <sub>3</sub>

Fixierlösung 1

10% (v/v)	konz. Essigsäure
40% (v/v)	Methanol
2% (v/v)	Glycerol

Fixierlösung 2

50% (v/v)	Methanol
1% (v/v)	Glycerol

### 2.9.11 Cycloheximid-Chase

Der Cycloheximid-Chase ist eine Methode, die Degradationsrate eines ERAD-Substrats zu untersuchen. Bei Cycloheximid handelt es sich um ein Antibiotikum, das von *Streptomyces griseus* synthetisiert wird. Es hemmt die Elongation der Translation, was zum Abbruch der Proteinsynthese führt. Dadurch werden keine neuen Proteine synthetisiert und es ist möglich die Degradation eines ERAD-Substrats zu studieren. Die methodische Vorgehensweise ist wie folgt:

Bei einem Cycloheximid-Chase wurde eine 20 ml Kultur mit einer Vorkultur angeimpft und bis zu OD<sub>600</sub>=1 unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Die Translation wurde daraufhin mittels Cycloheximid gestoppt, welches zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt wurde. Zu bestimmten Zeitpunkten, abhängig von der t<sub>1/2</sub> des zu untersuchenden Substrats, werden 2 ml-Aliquots abgenommen, für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert, und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut und die Zellen

aufgeschlossen, um die Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot weiter zu analysieren (siehe Punkt 2.9.2 und Punkt 2.9.3).

## 2.10 Hefe-spezifische Methoden

### 2.10.1 Wachstumstest auf festem Nährmedium

Dieser Wachstumstest wird verwendet, um die Wachstumsfähigkeit eines bestimmten Hefestammes unter Stressbedingungen zu untersuchen. Hierzu wurde aus einer Übernachtskultur eine 1:50 Verdünnung in sterilem Wasser angesetzt und die Zellzahl mit einer Neubauer „improved“ Zählkammer unter einem Lichtmikroskop bestimmt (siehe Punkt 2.7.1). Die Zellzahl wurde nun auf  $2 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$  eingestellt und davon wurden 3 aufeinanderfolgende 1:10 Verdünnungen hergestellt, so dass man Zellsuspensionen mit  $2 \times 10^2$ ,  $2 \times 10^1$  und 2 Zellen/ $\mu\text{l}$  erhielt. Aus diesen Verdünnungen wurden in absteigender Folge je 5  $\mu\text{l}$  auf eine vorgewärmte YPD-Platte getropft, um  $10^4$ - $10^1$  Zellen auf die einzelnen Bereiche aufzutragen. Die Hefezellen wurden zur Untersuchung der Stressregulation auf Platten mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$  der stressinduzierenden Chemikalie Tunicamycin inkubiert. Je eine Platte wurde anschließend bei verschiedenen Temperaturen für 3 Tage inkubiert und dokumentiert mit dem Gel-Dokumentationssystem von Peqlab.

### 2.10.2 *In vivo* Protein-Import-Assay

In diesem Assay nutzt man ein *URA3*-Reportergen, vor dessen Sequenz entweder die Signalsequenz eines Proteins kloniert wurde, das cotranslational- oder posttranslational in das ER importiert wird. Falls das Reportergen-Produkt Orotidin-5-Phosphat Decarboxylase in das Lumen importiert wird, wird es inaktiv und der Hefestamm ist nicht fähig ohne äußere Uracil-Zufuhr zu wachsen. Liegt jedoch ein Importdefekt vor, bleibt das Genprodukt aktiv und der Hefestamm ist für Uracil prototroph (siehe Abb. 2.3).

Die verwendeten Konstrukte wurden in Ng et al., 1996 und Ng et al., 2007 vorgestellt (Ng et al., 1996, 2007). Als Beispiel für den cotranslationalen Transport wurde die DNA-Sequenz der ersten 70 Aminosäuren inklusive der Signalsequenz vom *PHO8*-Gen unter der Kontrolle des *PHO5*-Promotors vor das *URA3*-Gen kloniert (Ng et al., 1996, 2007). Für den posttranslationalen Import wurden die ersten 110 Aminosäuren des CPY-Proteins inklusive der Signalsequenz verwendet (Ng et al., 1996, 2007). Beide Konstrukte wurden in den pRS313-Vektor kloniert, der in diesem Versuchsansatz als Vektorkontrolle diente und ein *HIS*-Marker gen enthält (Ng et al., 1996, 2007).

Bei der Versuchsdurchführung wurden alle drei Konstrukte (*PHO8-URA3*-pRS313, *CPY-URA3*-pRS313 und pRS313) in den zu untersuchenden Hefestamm mittels Lithium-Acetat-Transformation eingeschleust und auf d/o His-Selektionsmedium ausplattiert und 3 Tage inkubiert (siehe Punkt 2.8.9). Anschließend wurden die Transformanten zu einem Wachstumstest eingesetzt, wobei die Verdünnungen einmal zur Wachstumskontrolle auf d/o His-Medium inklusive Uracil und einmal für den tatsächlichen Importtest auf d/o His Ura-Platten getropft und für drei Tage inkubiert wurden. Es wurden Verdünnungen von  $10^5$  bis  $10^1$  Zellen verwendet.

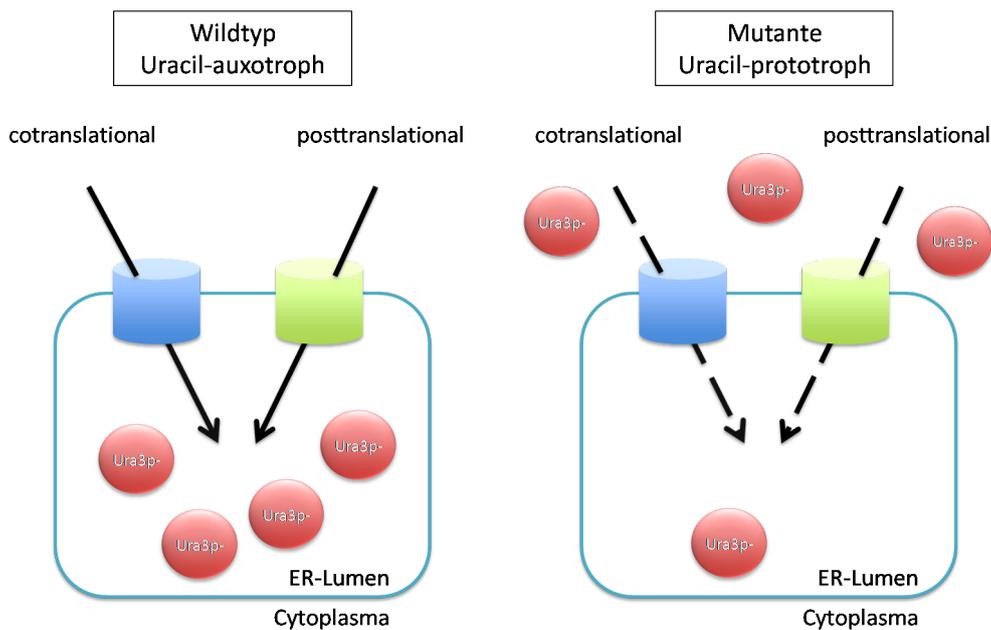


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des *in vivo* Protein-Import-Assays

Links ist ein Wildtyp dargestellt, dessen Import sowohl cotranslational (*PHO8-URA3*) als auch posttranslational (*CPY-URA3*) funktioniert. Dadurch wird das *URA3*-Gen in das ER-Lumen transportiert und damit inaktiv. Dieser Wildtyp ist somit auxotroph für Uracil. Rechts ist eine Mutante mit Protein-Import-Defekt dargestellt. Das *URA3*-Reporter-gen verbleibt im Cytoplasma und kann zum Wachstum auf Selektionsmedium ohne Uracil genutzt werden. Diese Mutante ist Uracil-prototroph. Die schematischen grünen und blauen Transportkanäle sollen die unterschiedlichen Importwege verdeutlichen (verändert nach Ng et al., 1996).

### 2.10.3 Kreuzung zweier haploider Stämme

Bei der Kreuzung eines frisch ausgestrichenen Hefestammes mit „mating type“  $\alpha$  und eines Stammes mit „mating type“  $a$  werden auf einer YPD-Platte Proben von beiden Stämmen auf einem Bereich von etwa  $1 \text{ cm}^2$  mit einem sterilen Zahnstocher vermischt. Die Platte

wurde im Folgenden für 3-5 h bei 30 °C inkubiert. Mit einer sterilen Impföse wurde nach der angemessenen Zeitdauer vorsichtig eine Probe entnommen und in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert. Davon wurden 30 µl auf den Randbereich einer vorgewärmten YPD-Platte in einer etwa 3 cm geraden Linie getropft. Mittels eines Mikromanipulators wurden mindestens 20 Zygoten mit charakteristischer Hantelform aus dem Zellgemisch isoliert und 2-3 Tage bei 30 °C im inkubiert.

#### 2.10.4 Sporulation und Dissektion eines diploiden Stammes

Bei der Sporulation handelt es sich um einen Überlebensmechanismus der Hefezellen, da Hefe bei Nährstoffmangel, z.B. Mangel einer Kohlenstoffquelle, Sporen bilden, die in ihrer Replikation arretiert und durch eine dicke Zellwand von Umwelteinflüssen geschützt sind. Wird also Glukose als Kohlenstoffquelle entzogen und anstatt dessen das nicht-fermentierbare Kaliumacetat zur Verfügung gestellt, geht die Diploide in die Meiose und bildet Tetraden, die durch einen Ascus geschützt sind (siehe Abb. 2.4). Diesen Ascus kann man mittels  $\beta$ -Glucoronidase verdauen und hat dadurch Zugang zu den vier Sporen, die man anschließend vereinzeln kann.

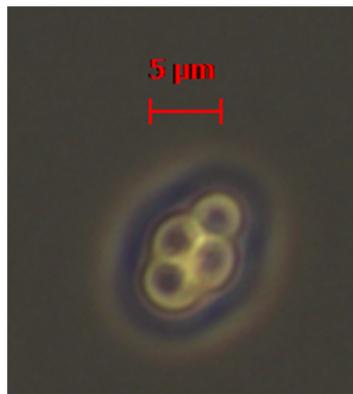


Abbildung 2.4: Eine Tetrade aus der Kreuzung der Stämme KRY875 und dem  $\Delta ire1$ -Stamm KRY160

Diese Aufnahme wurde drei Tage nach Umsetzung in Sporulationsmedium der Diploiden aus der Kreuzung des Stammes KRY875 und dem  $\Delta ire1$ -Stamm KRY160 mit einem Durchlichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab ist im Bild angegeben.

Dazu wurde eine Vorkultur 10 ml YPD mit dem gewünschten diploiden Stamm über Nacht bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Davon wurde 1 ml entnommen und die Probe 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml sterilem Wasser gewaschen um möglichst viel Glukose zu entfernen und die Sporulation effizienter zu machen. Die Zentri-

fugation erfolgte bei 3000 x g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Sporulationsmedium inklusive notwendiger Aminosäuren resuspendiert und den Ansatz anschließend 2-3 Tage bei 220 rpm und 30 °C inkubiert. Sobald die Probe unter dem Lichtmikroskop eine ausreichende Anzahl Tetraden zeigte, wurden 17 µl des Ansatzes entnommen und etwa 3 µl β-Glucuronidase zugegeben. Die Menge konnte abhängig vom Stamm variieren. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C etwa 20 bis 30 min inkubiert und anschließend mit 100 µl eiskaltem sterilem Wasser abgestoppt, das vorsichtig am Rand des Reaktionsgefäßes entlang pipettiert wurde, um die nun instabilen Tetraden nicht zu zerstören. Der Verdau war erfolgreich, wenn die Tetraden sich ohne große Anstrengung vereinzeln ließen, aber nicht zu leicht auseinander brachen.

Zur Dissektion wurden 30 µl des Verdaus gerade auf eine etwa 3 cm lange Linie am Rand einer YPD-Platte getropft. Mittels eines Mikromanipulators wurden nun jeweils etwa 10 Tetraden vereinzelt und anschließend für 2-3 Tage im Inkubator bei 30 °C inkubiert. Die Tetraden wurden durch Replikation auf geeignetem Selektionsmedium auf Vorhandensein der gesuchten Markergene getestet.

### 2.10.5 Colony Blot

Diese Methode beruht auf der Publikation von Knop et al., 1996, die damals verwendet wurde, um Mutanten zu isolieren, die eine Störung beim ERAD aufwiesen (Knop et al., 1996). Als Indikator dafür diente das ERAD-Modellsubstrat CPY\*, das bei einem ERAD-Defekt stabilisiert wird. Diese Mutante trägt eine Punktmutation in einem hochkonservierten Bereich an Stelle 255 von Glycin zu Arginin, welche zu einer Fehlfaltung führt.

Bei dem Colony Blot wurden die zu untersuchenden Stämme auf Platten mit passendem Medium ausgestrichen oder, wie in dem *sec63*-Screen, ein Transformationsansatz ausplattiert. Diese Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden Hefen mit einem Stempel, auf dem ein Samttuch befestigt wurde, auf eine Nitrocellulosemembran überführt, die sich auf einer zweiten Platte befand. Diese Hefezellen waren nun in ein bis zwei Tagen bei 30 °C auf dieser Nitrocellulosemembran angewachsen und wurden durch die Nährstoffe aus dem Medium versorgt. Diese Membran wurde für eine Nacht auf Sporulationsmedium übertragen, wodurch die Expression der vakuolären CPY gesteigert wurde (Knop et al., 1996). Durch die anschließende 10stündige Inkubation der Membran auf Sporulationsmedium mit 4 µg/ml Cycloheximid wurde die Translation gestoppt. Die Membran wurde nun mit der Oberfläche nach unten auf Filterpapiere aufgelegt, die mit 3 ml Lysepuffer getränkt waren. Die Lyse der Hefen erfolgte für 1 h bei RT. Die Hefezellen wurden anschließend vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült und die Membran mit Blotto

für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Die folgende Detektion von CPY\* geschah nach dem unter Punkt 2.9.4 beschriebenen Prinzip der Immunfärbung und Detektion mittels Röntgenfilme und ECL. Durch die unterschiedliche Intensität der Schwarzfärbung der einzelnen Kolonien konnte auf eine höhere Konzentration und dadurch Stabilisierung von CPY\* geschlossen werden.

#### Lysepuffer

0,1% (w/v)	SDS
0,2 M	NaOH
0,5% (v/v)	β-Mercaptoethanol

### 2.10.6 UPR-*lacZ*-Assay

Die Aktivierung der UPR wurde mittels eines Reporter-Konstrukts (Plasmid pJC31) getestet, bei dem ein UPR-Element (UPRE) vor einen funktionsuntüchtigen CYC1-Promoter und ein *LacZ*-Reporter gen geschaltet ist (Cox et al., 1993). Als Kontrolle wurde das Plasmid pJC30 verwendet, bei dem das UPRE fehlt (Cox et al., 1993). Das Expressionsprodukt des *LacZ*-Gens, die β-Galaktosidase, kann das farblose Substrat ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid (ONPG) in Galaktose und in ortho-Nitrophenol spalten, das eine gelbe Farbe hat, welche im Photometer bei 420 nm gemessen werden kann (Cox et al., 1993).

Der zu untersuchende Hefestamm wurde mit beiden Plasmiden transformiert und in einer 20 ml Übernachtskultur bei 30 °C und 220 rpm bis zu einer  $OD_{600}=0,5$  inkubiert. Von der Kultur wurde  $OD_{600}=1$  entnommen und bei  $3000 \times g$  4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Es wurden 100 µl Chloroform und 50 µl 0,1% SDS zugefügt und für 10 sec gevortext. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 28 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 200 µl ONPG und Vortexen gestartet. Die Inkubation bei 28 °C wurde für etwa 20 min fortgesetzt, bis die Probe eine hellgelbe Farbe angenommen hatte. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 500 µl 1 M  $Na_2CO_3$  und Vortexen gestoppt, was den pH-Wert ins Basische verschiebt. Dadurch wird die β-Galaktosidase, die ein pH-Optimum bei etwa 6 hat, inaktiv. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei  $10000 \times g$  für 10 min 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die  $OD_{420}$  des Überstandes wurde in Glasküvetten bestimmt. Für eine Positivkontrolle wurde der Übernachtskultur 2 µg/mL Tunicamycin für 1 h vor Präparation der Zellen zugegeben. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller-units angegeben und nach folgender Formel berechnet (Guarente, 1983; Miller, 1972):

$$\text{Miller units} = \frac{\text{OD}_{420}}{\text{OD}_{600} \times \text{Volumen} \times \text{Zeit}} \times 1000$$

OD<sub>420</sub>: Optische Dichte des Produktes o-Nitrophenol

OD<sub>600</sub>: Optische Dichte der Kultur zum Zeitpunkt des Assays

Volumen: Menge von verwendetem Volumen der Kultur in ml

Zeit: in min

Z-Puffer

60 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	KCl
1 mM	MgSO <sub>4</sub>
0,27%	β-Mercaptoethanol

ONPG-Stocklösung

4 mg/ml	ONPG
in Z-Puffer	

## 3 Ergebnisse

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Rolle von Sec63p während des ERAD zu klären. Dazu sollte ein Screen etabliert werden, um Mutanten zu finden, die CPY\* akkumulieren, was ein Anzeichen für einen möglichen ERAD-Defekt sein kann (Knop et al., 1996). Die *sec63*-Stämme, die während dieses Screens eine CPY\*-Akkumulation aufwiesen, habe ich anschließend isoliert, sequenziert und hinsichtlich ihrer Sensitivität für verschiedene Temperaturen und Stress charakterisiert. Es folgte eine Untersuchung bezüglich möglicher Proteinimport-Defekte und ihres generellen UPR-Statuses. Besonderes Augenmerk habe ich dabei auf die Degradation verschiedener löslicher und transmembraner Substrate in diesen neuen *sec63*-Stämmen gelegt.

### 3.1 Etablierung des *sec63*-Mutanten-Screens

#### 3.1.1 Deletion von *SEC63*

Für den Screen musste zunächst ein Stamm konstruiert werden, in dem *SEC63* auf einem *URA3*-Plasmid codiert ist, um dieses durch ein *LEU2*-Plasmid zu ersetzen in das mittels error-prone-PCR verschiedene Punktmutationen in das *SEC63*-Gen eingefügt wurden (siehe Punkt 2.8.19 und Punkt 2.8.7). Dafür musste das genomische *SEC63* in einem diploiden Stamm deletiert werden, der zuvor mit einem *SEC63-URA3*-Plasmid transformiert worden war (siehe Punkt 2.8.5). Dieser diploide Stamm wurde durch Kreuzung der Stämme W303-1C und W303-1A erzeugt (siehe Punkt 2.10.3). Nur der W303-1C-Stamm trägt zusätzlich das *prc1-1*-Allel, das für CPY\* codiert und als Substrat und Indikator für Degradationsdefekte dienen sollte (Finger et al., 1993). Der erzeugte diploide Stamm trägt eine Kopie des *prc1-1*-Allels, sowie zwei genomisch codierte wildtypische *SEC63*-Gene, wovon wiederum eines deletiert werden sollte, und eine zusätzliche Kopie von *SEC63* auf einem *URA3*-Plasmid. Die Deletion einer Kopie des genomischen *SEC63* wurde mit der Deletionskassette von Plasmid pYM-*natNT2* wie unter Punkt 2.8.5 beschrieben, durchgeführt (Janke et al., 2004). Das

*natNT2*-Gen, das durch homologe Rekombination an die Stelle des *wtSEC63*-Gens eingefügt wurde, vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin (Janke et al., 2004).

Der diploide Stamm wurde anschließend zur Sporulation eingesetzt und die erhaltenen Tetraden vereinzelt (siehe Punkt 2.10.4). In Abb. 3.1 sind beispielhaft zwei Reihen (C und D) von haploiden Stämmen gezeigt, die jeweils aus derselben Tetrade stammten. Nach Vereinzelung der Tetraden, wurden die Sporen zunächst auf YPD-Medium inkubiert und, um den Genotyp dieser Stämme zu charakterisieren, anschließend auf weitere Selektionsmedien überführt. Einmal sollte auf Vorhandensein des *wtSEC63-URA3*-Plasmids selektioniert werden und zusätzlich noch auf die Anwesenheit des Resistenzgens, was wiederum auf Deletion des genomischen *wtSEC63*-Gens schließen lässt. Durch Wachstum bzw. Nicht-Wachstum der verschiedenen Stämme konnte auf folgende Genotypen geschlossen werden:

- C3/D4:  $\Delta sec63$  > kein Wachstum
- C4/D6: *wtSEC63* > Wachstum auf YPD
- C5/D5: *wtSEC63*, *SEC63-URA3*-Plasmid > Wachstum auf d/o Ura
- C6/D3:  $\Delta sec63$ , *SEC63-URA3*-Plasmid > Wachstum auf d/o Ura mit Nourseothricin

Zur weiteren Kontrolle der korrekten Vereinzelung der Tetraden und der Insertion des Resistenzgens wurde die genomische DNA der Stämme isoliert und zur PCR eingesetzt (siehe Punkt 2.8.1 und Punkt 2.8.6). Die ungefähre Positionen der verwendeten Primer sind in Abb. 3.1 C gezeigt. Für beide PCRs wurde ein *forward* Primer verwendet, der in der 5'UTR des *SEC63*-Gens bindet. Die *reverse* Primer sind komplementär zu dem *SEC63*-Gen bzw. zu dem *natNT2*-Gen. Die PCR-Produkte wurden mit einem Agarose-Gel analysiert (Abb. 3.1 B). Die PCR-Ergebnisse bestätigten sowohl die Genotypen als auch die Haploidie. Leider trugen beide isolierte Stämme das wildtypische *PRC1*-Allel. Das *prc1-1*-Allel wurde durch Kreuzen von C6 mit dem Schwesterstamm D5 eingefügt. Dadurch wurde der Stamm KRY875 erzeugt, der als Ausgangsstamm in dem error-prone-Screen zur Isolation neuer *sec63*-Mutanten diente (siehe Punkt 2.8.19).

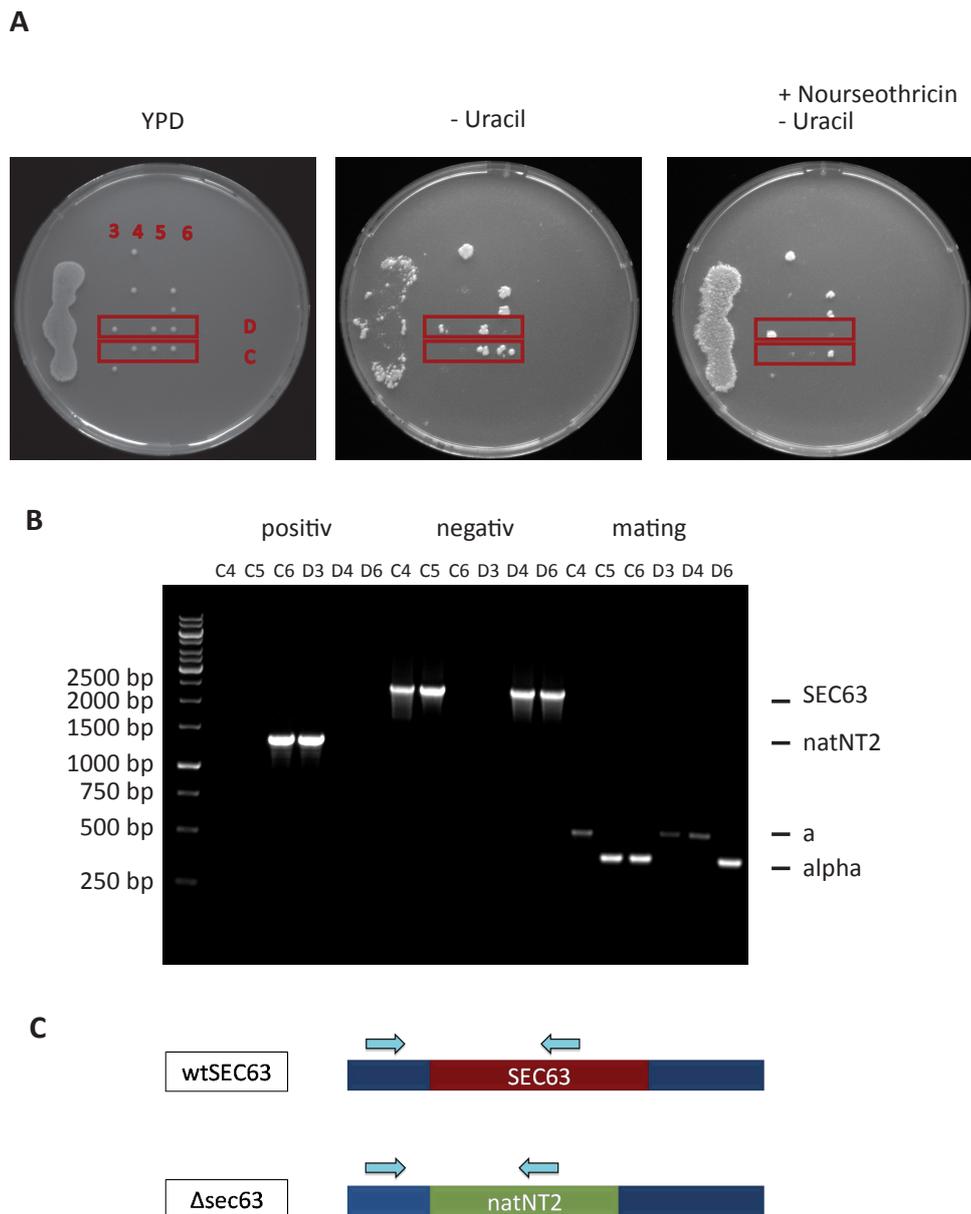


Abbildung 3.1: Identifikation des  $\Delta sec63$ -Stammes mit *SEC63-URA3-pRS316*

**A:** Reihe C und D zeigen jeweils drei haploide Stämme, die aus der Vereinzlung aus je einer Tetrade stammen. Diese haploiden Stämme sind auf YPD vereinzelt und auf d/o Ura-Medium und d/o Ura-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Nourseothricin gestempelt. **B:** Die genomische DNA der einzelnen Stämme wurde zur PCR eingesetzt und auf Deletion von *SEC63* bzw. Vorhandensein des Resistenzgens *natNT2* sowie auf Haploidie getestet. Die PCR-Produkte wurden mittels 1%igem Agarosegel analysiert. Größen der PCR-Produkte: Positiv-Kontrolle: 1294 bp, Negativkontrolle: 1701 bp, „mating type“  $\alpha$ : 404 bp, „mating type“ a: 544 bp; als Marker wurde der Gene Ruler 1 kb von Fermentas verwendet. **C:** Die Bindungsbereiche der Primer für die positive und negative Kontroll-PCRs sind angegeben. Beide Male wurde der gleiche *forward* Primer verwendet, der in der 5'UTR-Region von *SEC63* bindet und verschiedene *reverse* Primer: Je einer komplementär zum *wtSEC63*-Gen und zum *natNT2*-Gen.

### 3.1.2 Proteinaufreinigung von CPY zur Antikörperherstellung

Für die geplanten Experimente wurde ein Antikörper zur Erkennung von CPY benötigt. Zur Aufreinigung von CPY als Antigen wurde ein Protokoll von Colin Stirling verwendet (siehe Punkt 2.9.8). Dabei wurde ein 370 AS großes, His-getaggttes Fragment von CPY genutzt (AS 155-525; 43 kDa). Die genaue Prozedur der Aufreinigung ist unter Punkt 2.9.8 beschrieben. Auf dem in Abb. 3.2 dargestellten Proteingel wird gezeigt, dass der größte Anteil des CPY-Proteins aus dem Pellet durch Inkubation mit dem Bindepuffer aus der Zellmasse herausgelöst werden konnte. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Ultrafiltrationsröhrchen gegen PBS umgepuffert und von Urea weitgehend gereinigt bis zu einer Konzentration unter 0,5 M. Es konnte eine Proteinkonzentration des CPY-Fragments von 1,2 mg/ml mittels Mikroplatten-„Reader“ ermittelt werden (siehe Punkt 2.9.6). Die Antikörperherstellung wurde von der Gruppe von Martin Jung (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg) durchgeführt.

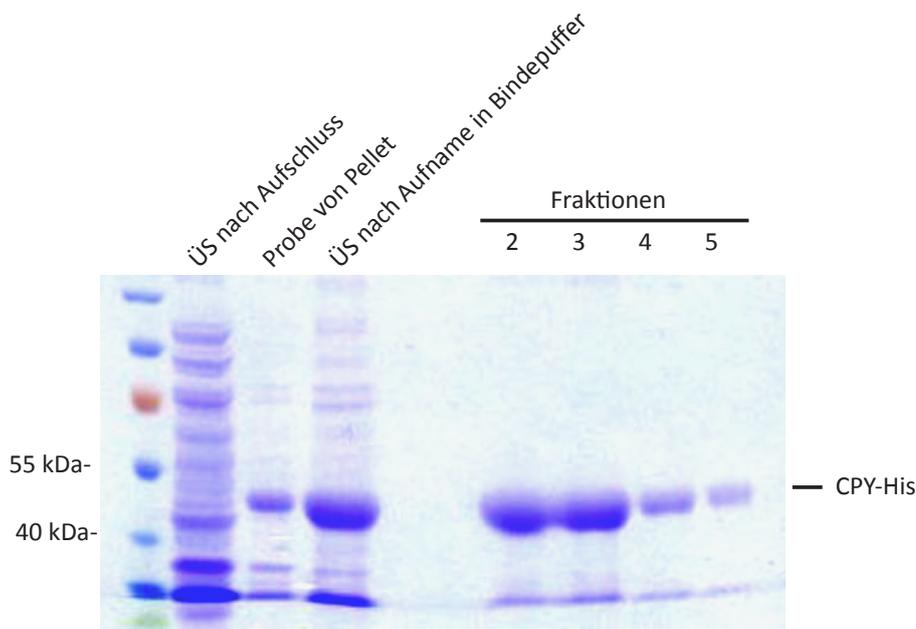


Abbildung 3.2: Aufreinigung des CPY-Fragments mit His-Tag

Dieses 10%ige Polyacrylamid-Gel zeigt verschiedene Proben die während der Aufreinigung des His-getaggtten CPY-Fragments aus einer 500 ml-Hefekultur analysiert wurden. Darunter ist je eine Probe des Überstandes nach Aufschluss der Zellen, des Pellets nach Aufnahme in Bindepuffer und des Überstandes nach Aufnahme in Bindepuffer, der als Auftrag diente. Außerdem sind Proben der Fraktionen 2-5 des Eluats aufgetragen. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 43 kDa. Als Marker wurde PageRuler Prestained Marker von Fermentas verwendet.

### 3.1.3 Proteinaufreinigung des pp $\alpha$ F zur Antikörperherstellung

Der pp $\alpha$ F wurde ebenfalls aufgereinigt, um als Antigen zur Antikörperherstellung zu dienen. Dazu wurde ein Protokoll (Bush et al., 1991) verwendet, dessen wesentliche Punkte nochmal unter Punkt 2.9.9 angegeben sind. Abb. 3.3 zeigt ein Gel, auf dem Proben einer Aufreinigung aus einer 750 ml Bakterienkultur aufgetragen wurden. Zur Kontrolle wurde eine Probe des Pellets, des Auftrags und des Vorlaufs mitgeführt, sowie die Fraktionen 1 und 2 des Eluats (siehe Abb. 3.3). Die Konzentration des Proteins ist in den Kontrollen recht niedrig und schwer zu detektieren. Nach Elution konnte jedoch auf dem Gel in Höhe von 18 kDa aufgereinigtes Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3). Nach Ermittlung des Proteingehalts durch den Mikroplatten-„Reader“ konnte eine Konzentration des aufgereinigten Proteins von 700 ng/ml bestimmt werden (siehe Punkt 2.9.6). Dieses Protein ist nicht löslich bei einer Urea-Konzentration unter 4 M, weshalb diese Probe von dem Guanidin-HCl und Imidazol durch Dialyse in einen Puffer mit 8 M Urea und 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5 umgepuffert wurde. Die Antikörperproduktion wurde von der Firma Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg durchgeführt.

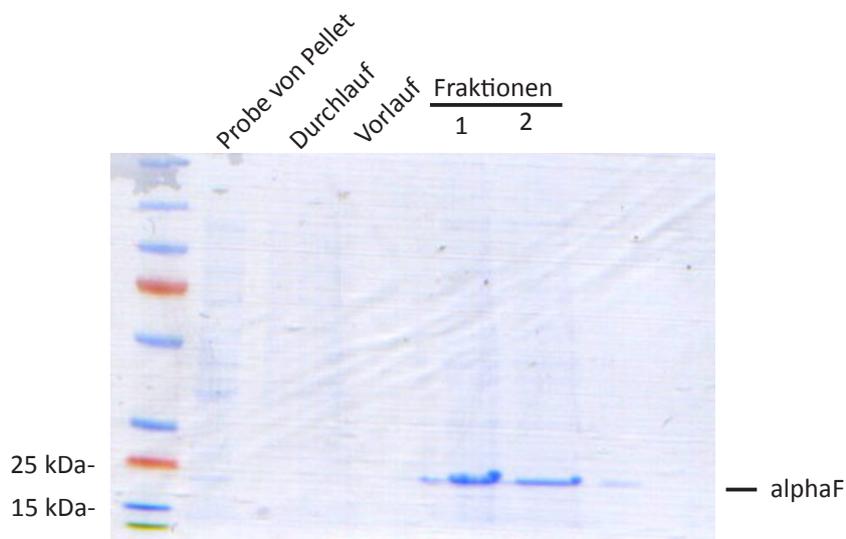


Abbildung 3.3: Aufreinigung des pp $\alpha$ F

750 ml Bakterienkultur wurden angeimpft, induziert und aufgeschlossen. Eine Probe des Pellets nach der Lyse ist zum Vergleich auf dem dargestellten 12,5%igen Gel aufgetragen, sowie eine Probe des Auftrags und eine Probe des Vorlaufs, was die Flüssigkeit darstellt, die vor den Fraktionen aufgefangen wird. Proben der Fraktionen 1 und 2 des Eluats sind gezeigt. Der pp $\alpha$ F hat ein Molekulargewicht von 18 kDa. Als Marker wurde PageRuler Prestained Marker von Fermentas verwendet.

### 3.1.4 Deletion von *DER1* in W303-1C

Zur Isolierung der neuen *sec63*-Mutanten sollte eine Methode verwendet werden, die erstmals in Knop et al., 1996, vorgestellt wurde (Knop et al., 1996). In dieser Publikation wurde *DER1* identifiziert und die Beteiligung von *DER1* bei der Degradation von CPY\* nachgewiesen. Zur Etablierung des unter Punkt 2.10.5 beschriebenen Colony Blots sollte der in Knop et al., 1996, vorgestellte *der1*-Deletionsstamm als Positivkontrolle dienen (Knop et al., 1996). Die Deletion von *DER1* wurde in W303-1C vorgenommen mit der unter Punkt 2.8.5 beschriebenen Methode. Ebenso wie bei der Deletion von *SEC63* wurde auch hier das Resistenzgen *natNT2* durch homologe Rekombination eingefügt (siehe Punkt 2.8.19).

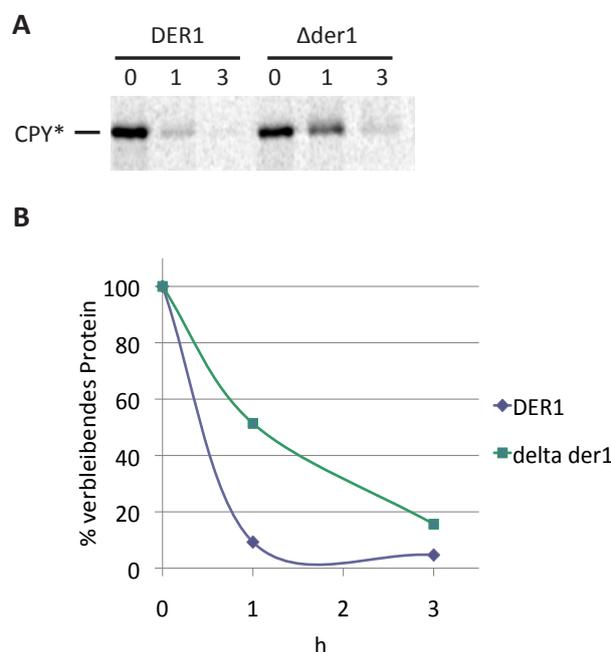


Abbildung 3.4: CPY\*-Degradation in W303-1C und  $\Delta der1$ -W303-1C

**A:** W303-1C und  $\Delta der1$ -W303-1C (KRY880) wurden im Pulse-Chase auf CPY\*-Degradation getestet. Die Zellen wurden zu  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l verdünnt, für 20 min bei 30 °C unter Schütteln gehungert und für 2 min gelabelt. Der anschließende Chase wurde bei den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt und die gefällten Überstände auf ein 10%iges Gel aufgetragen und mittels Autoradiographie analysiert. **B:** Graphische Darstellung der Degradation von CPY\*.

Wie in Abb. 3.4 dargestellt ist, wurde in dem anschließenden Pulse-Chase-Experiment eine deutliche Stabilisierung des genomisch codierten CPY\* beobachtet. Dies konnte ebenfalls per Colony Blot verifiziert werden (siehe Abb. 3.6). Die Stabilisierung des Substrats fällt jedoch nicht ganz so stark aus, wie bei Knop et al., 1996 (Knop et al., 1996). In deren

Abbildungen ist nach drei Stunden Chase-Zeit noch deutlich mehr CPY\* zu erkennen, was aber durch die unterschiedlich gewählten Parameter des Experiments erklärt werden könnte. Der  $\Delta der1$ -Stamm wurde im Weiteren KRY880 genannt und zur Positivkontrolle im Colony Blot verwendet.

### 3.1.5 Identifizierung von neuen *sec63*-Mutanten

Zur Identifizierung neuer *sec63*-Mutanten mit ERAD-Defekten habe ich 4000 Mutanten mittels des unter Punkt 2.8.19 beschriebenen Screens getestet. Es wurde ein Stamm konstruiert dessen genomische Kopie des *SEC63*-Gens deletiert ist und dessen *SEC63*-Gen auf einem *URA3*-Plasmid codiert ist. Zusätzlich trägt dieser Stamm (KRY875) ein *prc1-1*-Allel, das für das ERAD-Substrat CPY\* codiert. Der Stamm wurde mit einer Vielzahl von *sec63-LEU2*-Plasmiden transformiert, in die durch error-prone-PCR zufällige Punktmutationen eingefügt wurden. Durch Überstempelung auf eine Selektionsplatte mit FOA wurde auf *sec63-LEU2*-Plasmide selektioniert.

Weitere 3000 Kolonien wurden untersucht, die mittels EMS mutagenisiert wurden (siehe Punkt 2.8.18). Diese Kolonien wurden auf YPD angezogen und, wie unter Punkt 2.10.5 beschrieben, auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die Proteinbiosynthese wurde 10 h lang gestoppt, die Zellen lysiert und mittels Immunfärbung gegen CPY\* ausgewertet. Da bei der EMS-Mutagenese Mutationen im gesamten Genom eingefügt werden, wurden anschließend die auffälligen Kolonien mit einem wt*SEC63-URA3*-Plasmid transformiert. Erschienen Stämme nach Transformation hell auf dem Röntgenfilm, wurde auf die Kompensation der Degradationsstörung durch Sec63p geschlossen.

Aus den beiden Screens wurden insgesamt sechs Mutanten ausgewählt (*sec63-401* bis *sec63-406*). Sie stammen sämtlich aus dem Screen mittels error-prone-PCR und zeigen eins bis fünf Punktmutationen verteilt über verschiedene Bereiche des Gens (siehe Abb. 3.5). Die Stämme *sec63-401* und *sec63-402* tragen je eine Mutation in der DnaJ-Domäne, wobei beide nicht im HPD-Motiv lokalisiert sind, das eine essentielle Bedeutung bei der Kar2p-Interaktion hat (siehe Abb. 3.5; Greene et al., 1998). Eine einzelne Mutation in der Brl-Domäne wurde in *sec63-403* gefunden. Die Mutanten *sec63-404* und *sec63-406* haben beide zahlreiche Mutationen im C-terminalen Ende der Brl-Domäne und auch in der sauren Domäne (siehe Abb. 3.5). Außerdem haben beide Stämme je eine Mutation im Interaktionsbereich mit Sec62p (siehe Abb. 3.5). Die Stämme *sec63-405* und auch *sec63-406* weisen eine Mutation in der ersten Transmembrandomäne auf, was potentielle Strukturdefekte verursachen kann (siehe Abb. 3.5). Neben dieser Mutation trägt *sec63-405* ebenfalls eine Mutation in der Brl-Domäne (siehe Abb. 3.5). In Abb. 3.5 sind zusätzlich die Interaktionsbereiche von Sec63p

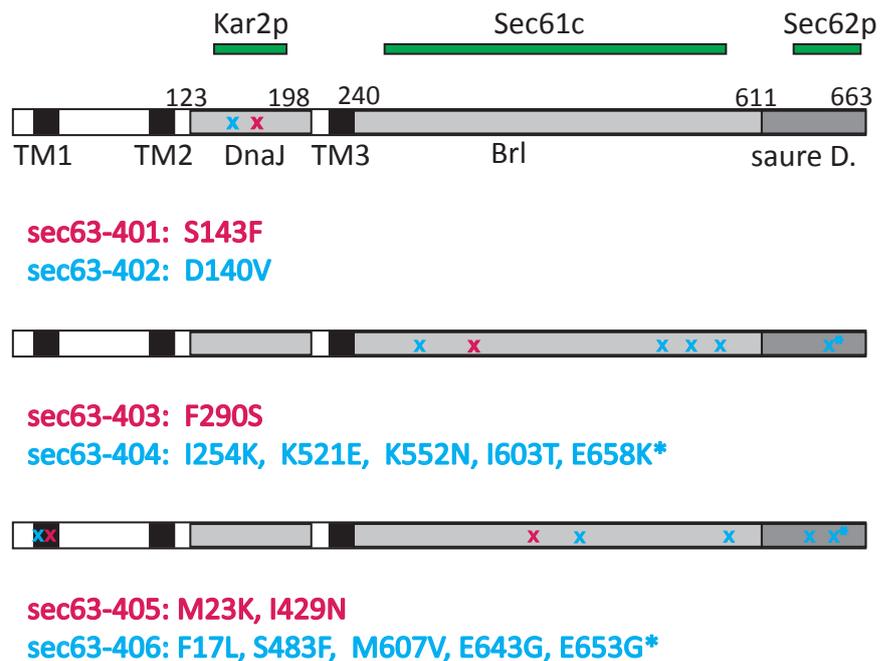


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Punktmutationen in den neuen *sec63*-Mutanten

Jeweils zwei Mutanten sind in einem Schema dargestellt. Zur Unterscheidung dient die jeweils blaue bzw. rote Farbe. Zur besseren Darstellung der Lokalisation sind die drei Transmembrandomänen (TM), die DnaJ-Domäne, die Brl-Domäne und die saure Domäne eingezeichnet. Die Punktmutationen, die mit einem \* markiert sind, liegen im Interaktionsbereich mit Sec62p. Zusätzlich sind Interaktionsbereiche von Sec63p mit Kar2p, Sec61-Komplex und Sec62p in grün am oberen Bildrand angezeigt.

mit Kar2p, dem Sec61-Komplex und Sec62p angegeben, was eine Übersicht geben soll auf mögliche Interaktionsstörungen mit den angegebenen Proteinen.

Wie in Abb. 3.6 dargestellt, zeigte vor allem *sec63-402*, neben der Positivkontrolle KRY880, eine starke CPY\*-Akkumulation, was auf eine Störung des ERAD dieses Substrates schließen lässt (Knop et al., 1996). Die Mutante *sec63-402* hat einen Austausch von Aspartat zu Valin an Position 140, was in der DnaJ-Domäne liegt (siehe Abb. 3.6). Die zweite Mutante, die in diesem Bereich eine Mutation hat, *sec63-401*, zeigt hingegen nur eine leichte Stabilisierung des Substrats, wie auch alle anderen fünf Mutanten (siehe Abb. 3.6).

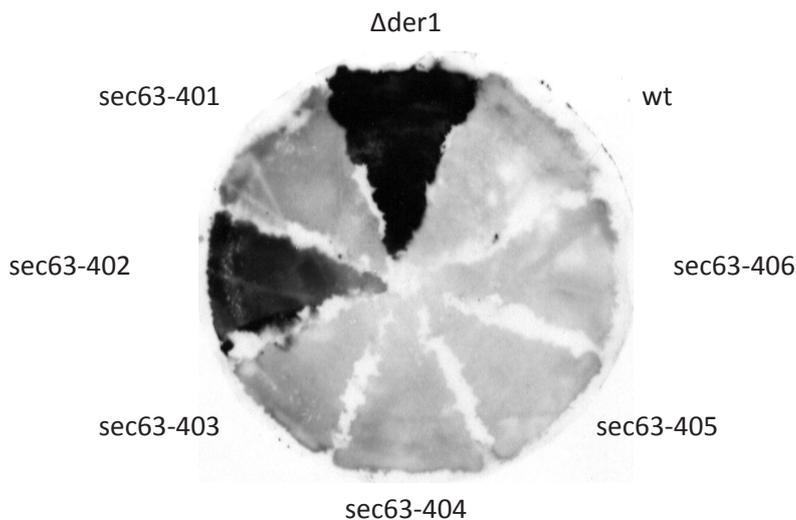


Abbildung 3.6: CPY\*-Akkumulation in den neuen *sec63*-Mutanten

Die isolierten *sec63*-Mutanten wurden mittels Colony Blot auf CPY\*-Akkumulation getestet. Dafür wurden die Stämme auf einer Nitrocellulosemembran auf der Oberfläche einer YPD-Platte inkubiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht auf Sporulationsmedium übertragen und darauffolgend auf Sporulationsmedium mit 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cycloheximid für 10 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und mittels Antikörper gegen CPY\* angefärbt. Als Kontrollen wurden der  $\Delta der1$ -Stamm KRY880 und der wt-Stamm KRY875 verwendet.

## 3.2 Charakterisierung der neuen *sec63*-Mutanten

### 3.2.1 Wachstum und Protein-Import der *sec63*-Mutanten

#### 3.2.1.1 Temperatur- und Stresssensitivität der neuen *sec63*-Mutanten

Eine Sensitivität für erhöhte und erniedrigte Temperaturen wurde oft bei Protein-Importdefekten Mutanten des Transportkomplexes nachgewiesen (Pilon et al., 1998; Rothblatt et al., 1989). Stresssensitivität, zum Beispiel gegenüber Tunikamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, deutet währenddessen meist auf einen ERAD-Defekt hin (Lipson et al., 2008; Tran et al., 2011). Deshalb wurden die isolierten *sec63*-Mutanten auf ihre Temperatur- und Stresssensibilität getestet (siehe Abb. 3.7). Dazu wurden sie auf YPD-Platten mit bzw. ohne Tunicamycin bei 20 °C, 30 °C, 35 °C und 37 °C inkubiert (siehe Abb. 3.7). Zum Vergleich wurden außerdem der Wildtypstamm KRY875 und die beiden Mutanten *sec63-1* und *sec63-201* mitgeführt. Die Mutante *sec63-1* trägt die Mutation A179T in der DnaJ- Domäne, die die Interaktion mit Kar2p inhibiert, wodurch ein posttranslationaler Importdefekt verursacht

wird, sowie ein ERAD-Defekt (Rothblatt et al., 1989). Bei *sec63-201* sind die letzten 27 Aminosäuren im C-Terminus trunziert, wodurch die Interaktion mit Sec62p gestört ist (Ng et al., 1996). Außerdem hat *sec63-201* einen Import-Defekt und einen Defekt bei der Karyogamie (Ng et al., 1996).

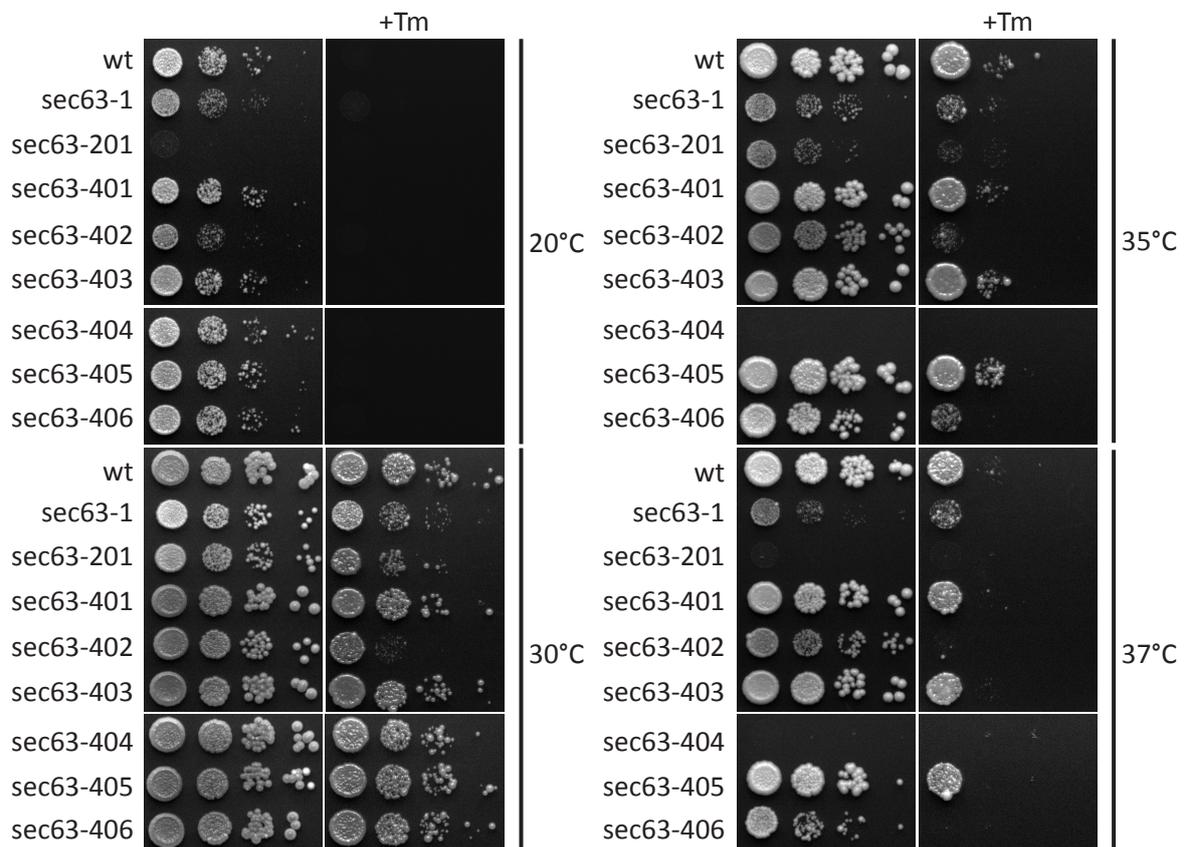


Abbildung 3.7: Wachstumstest der neuen *sec63*-Mutanten auf festem Medium

Die sechs neuen *sec63*-Mutanten sowie der wildtypische KRY875 wurden in den Zellkonzentrationen  $10^4$  bis  $10^1$  auf YPD-Platten aufgetropft. Zum Vergleich wurden die Mutanten *sec63-1* und *sec63-201* mitgeführt. Um die Stresssensibilität zu testen wurde eine Testreihe mit YPD inklusive 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tunicamycin verwendet. Die Platten wurden für 3 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Die beiden Kontroll-Mutanten *sec63-1* und *sec63-201* zeigten sogar bei 30 °C ein langsames Wachstum im Vergleich mit den neuen *sec63*-Mutanten, wie man anhand der Koloniegröße erkennen kann (siehe Abb. 3.7). Beide zeigten auch Temperatursensibilität bei höheren Temperaturen und *sec63-201* im Besonderen auch bei 20 °C (siehe Abb. 3.7). Von den neuen Mutanten ist bei *sec63-402* Temperatursensibilität bei 20 °C und in schwächerem

Maße auch bei 35 °C und 37 °C zu sehen (siehe Abb. 3.7). Die Mutanten *sec63-403* und *sec63-405* zeigten keine Stress- oder Temperatursensitivität. Eine deutliche Sensitivität bei höheren Temperaturen zeigten ebenfalls die Mutanten *sec63-404* und in nicht ganz so deutlichem Maße *sec63-406* (siehe Abb. 3.7). Diese Mutanten tragen beide Punktmutationen im C-terminalen Bereich der Brl-Domäne und der sauren Domäne (siehe Abb. 3.5). Sie wiesen bei 30 °C jedoch keine Sensitivität für Tunicamycin auf (siehe Abb. 3.7). Auffällig ist die Tunicamycinsensitivität von *sec63-402* bereits bei 30 °C (siehe Abb. 3.7). Diese wird bei höheren Temperaturen noch prominenter, was ebenfalls dafür spricht, dass ERAD in *sec63-402* gestört ist.

### 3.2.1.2 Temperatur- und Stresssensitivität in Mutanten mit vereinzelt Domänen

Die beobachteten Wachstumsdefekte bei erhöhten Temperaturen und bei Tunicamycin-Zugabe habe ich im Folgenden genauer untersucht. Die Punktmutationen sind bei *sec63-404* und *sec63-406* in der Brl- und der sauren Domäne lokalisiert. Bei *sec63-406* gibt es noch zusätzlich eine Mutation in der ersten Transmembrandomäne (siehe Abb. 3.5). Diese Mutanten wurden nun gemäß der Verteilung ihrer Mutationen nach Transmembrandomänen inklusive DnaJ-Domäne, Brl-Domäne und saurer Domäne umklontiert, um die Effekte bestimmten Mutationen genauer zuordnen zu können.

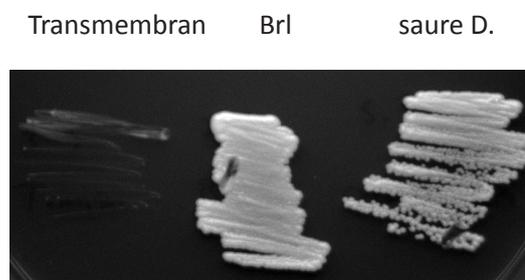


Abbildung 3.8: Vereinzelt *sec63-406*-Domänen auf FOA-Medium

KRY875 wurde mit je einem Domänen-Konstrukt der Mutante *sec63-406* (Transmembrandomänen, Brl-Domäne oder saure Domäne) transformiert und auf d/o Leu-Medium 3 Tage lang bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde je eine Kolonie auf d/o Leu-Medium mit 0,1% FOA ausgestrichen und ebenfalls 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Brl- und die saure Domäne wurden an Stelle 1845/1841 bp über die *Pst*I-Schnittstelle voneinander getrennt. Dieses Enzym schnitt zusätzlich im pRS315-Vektor, so dass die Transmembran- und Brl-Domäne von dem Vektor inklusive saurer Domäne getrennt wurden. Um

die Transmembrandomänen von dem C-terminalen Rest zu trennen, wurde in dem *sec63*-ORF mit *SpeI* an Stelle 400/404 bp und in dem Vektor mit *HindIII* geschnitten. Die Domänen wurden über Ligation mit einem gleichermaßen geschnittenen *wtSEC63*-pRS315-Vektor kombiniert. Bei der Mutante *sec63-406* wurde zusätzlich noch die Mutation in der ersten Transmembrandomäne von den anderen Domänen getrennt. Dieses Konstrukt war jedoch nach FOA-Selektion nicht lebensfähig (siehe Abb. 3.8). Möglicherweise kam es durch Anwesenheit der Mutationen in Brl- und saurer Domäne zu Stabilisierungen dieser Mutation.

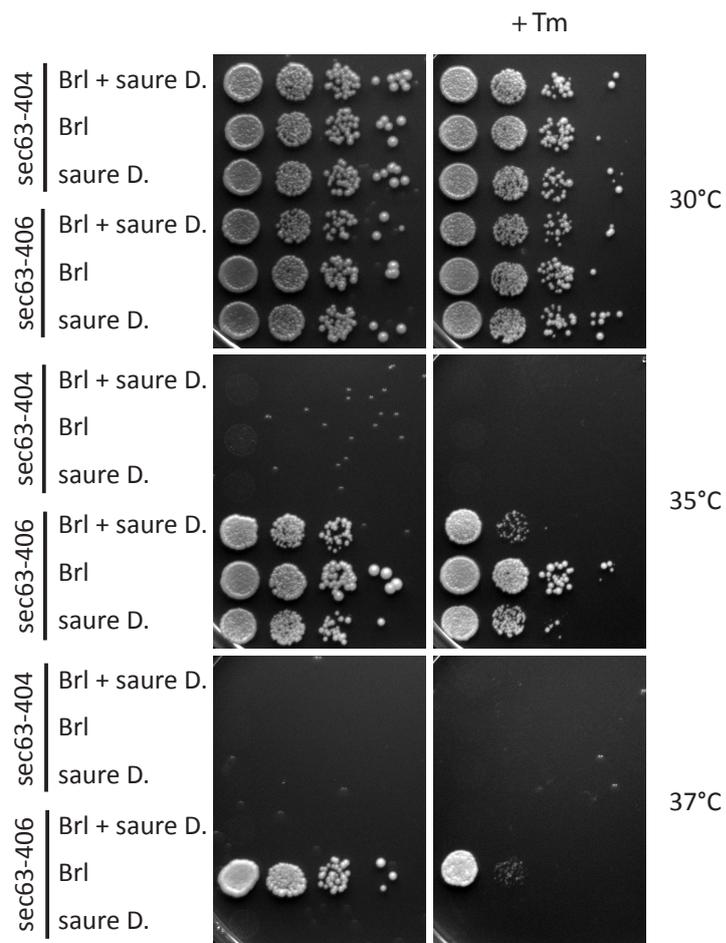


Abbildung 3.9: Wachstumstest auf festem Medium mit *sec63-404* und *sec63-406* mit einzelner Brl- und saurer Domäne

Die Mutanten *sec63-404* und *sec63-406* mit Mutationen in allen Bereichen und die Vereinzelungen nach Mutationen in der Brl oder sauren Domäne wurden mit  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen auf YPD-Platten mit und ohne  $0,25 \mu\text{g/ml}$  Tunicamycin aufgetropft. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen 3 Tage lang inkubiert.

Die vereinzelt Domänen von *sec63-404* zeigten gleichermaßen Temperatursensitivität ab 35 °C (siehe Abb. 3.9). Offenbar trugen sowohl die Mutationen in der Brl- als auch in der sauren Domäne zu dem Wachstumsdefekt bei erhöhten Temperaturen in *sec63-404* bei. In *sec63-406* war eindeutig eine stärkere Temperatursensitivität durch die Mutationen in der sauren Domäne zu erkennen (siehe Abb. 3.9). Bei dem *sec63-406*-Stamm, der nur die Mutationen in der Brl-Domäne trägt, war keine Temperatursensitivität mehr nachzuweisen (siehe Abb. 3.9).

Bei der Mutante *sec63-405* wurden die beiden Mutationen in der ersten Transmembrandomäne und in der Brl-Domäne auf dem oben beschriebenen Weg voneinander getrennt. Die Mutante *sec63-405* zeigte schon vorab keine Temperatursensitivität (siehe Abb. 3.7). Dieses Verhalten wurde in den beiden Mutanten mit den vereinzelt Domänen ebenfalls beobachtet (siehe Abb. 3.10). Offensichtlich kompensierten die Mutationen keinen potentiellen Wachstumsdefekt.

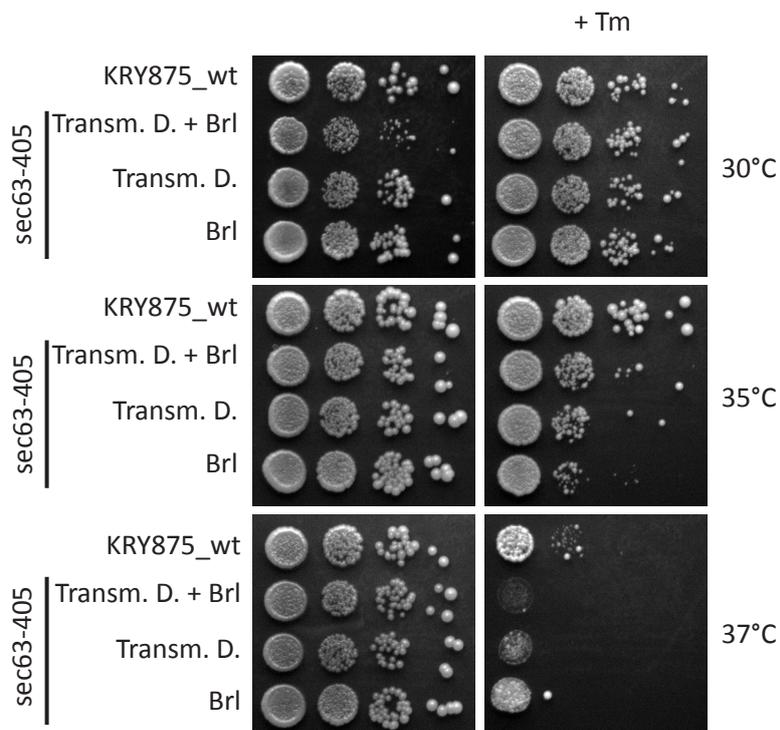


Abbildung 3.10: Wachstumstest auf festem Medium von *sec63-405* und den Stämmen mit vereinzelt Domänen

Der wildtypische KRY875, wie auch die *sec63-405*-Mutante und deren vereinzelt Domänen wurden in den Verdünnungen  $10^4$  bis  $10^1$  auf YPD-Platten mit und ohne 0,25 µg/ml Tunicamycin getropft und bei den angegebenen Temperaturen 3 Tage lang inkubiert.

## 3.2.2 Co- und posttranslatonaler Import

### 3.2.2.1 *In vitro* Protein-Import-Assay mit den neuen *sec63*-Mutanten

Ich habe die Mutanten weiterhin mittels *in vitro* Protein-Import-Assay auf ihre co- und posttranslationalen Importkompetenz getestet, da Sec63p eine Rolle bei beiden Importwegen spielt (Brodsky et al., 1995).

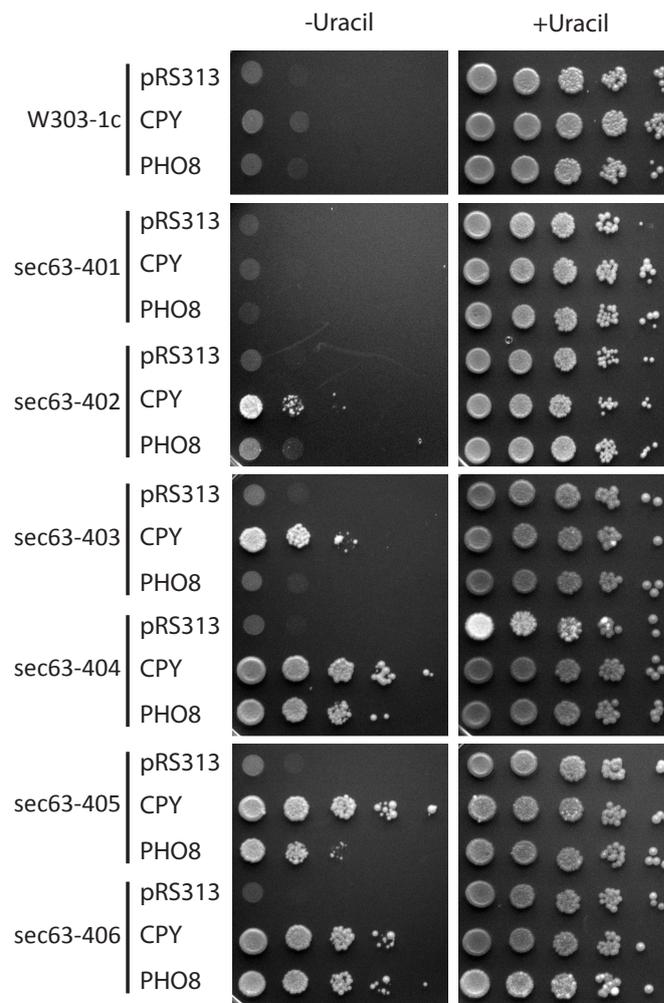


Abbildung 3.11: *In vivo* Protein-Import-Assay der neuen *sec63*-Mutanten

Die *sec63*-Mutanten und zur Kontrolle W303-1C wurden mit jeweils drei verschiedenen Plasmiden transformiert. 1. Ein Reporterplasmid für cotranslationalen Import pRS313-*PHO8-URA3*, 2. Ein Reporterplasmid für posttranslationalen Import pRS313-*CPY-URA3* und 3. Zur Kontrolle der leeren pRS313-Vektor. Diese Stämme wurden anschließend auf Selektionsmedium ohne Histidin oder ohne Histidin und ohne Uracil in den Verdünnungsstufen  $10^5$  bis  $10^1$  Zellen aufgetropft. Die Platten wurden bei 30 °C für 3 Tage inkubiert.

Dafür wurde das *URA3*-Reporter gen verwendet, vor das einmal die Signalsequenz des cotranslational importierten Substrats Pho8p bzw. die Signalsequenz des posttranslational transportierten CPY kloniert wurde (siehe Punkt 2.10.2, Ng et al., 2007, 1996). Wenn das Ura3p in das ER importiert wird, wird es inaktiv und die Hefezellen sind für Uracil auxotroph (Ng et al., 1996). Liegt jedoch ein Importdefekt vor, sind die Hefen in der Lage auf Selektionsmedium ohne Uracil zu wachsen (Ng et al., 1996).

Wie in Abb. 3.11 dargestellt, liegt bei *sec63-402* ein leichter posttranslationaler Importdefekt vor und ein etwas stärkerer bei *sec63-403*. In *sec63-401* kann kein Importdefekt nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11). Bei *sec63-404*, *sec63-405* und *sec63-406* liegen Defekte in beiden Importwegen vor, wobei der posttranslationale Import besonders bei *sec63-405* stärker gestört ist als der cotranslationale Import (siehe Abb. 3.11).

### 3.2.2.2 *In vivo* Protein-Import-Assay mit Mutanten mit vereinzelt Domänen

Die erzeugten *sec63*-Mutanten mit vereinzelt Domänen habe ich mittels *in vitro* Protein-Import-Assay auf Defekte im cotranslationalen oder posttranslationalen Import hin untersucht (siehe Punkt 2.10.2). Wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben, wurde dieser Assay bereits bei den Vollmutanten verwendet. Bei mehreren Mutanten konnten Importdefekte *in vivo* nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11). Nun sollte weiterhin untersucht werden, welche Domänen in welchem Maße zu den beobachteten Defekten beitragen.

Bei der Mutante *sec63-404* scheinen sowohl die Mutationen in der Brl-Domäne als auch in der sauren Domäne zu den Importdefekten beizutragen, wenn man diesen Assay mit dem Assay der Vollmutanten in Abb. 3.11 vergleicht (siehe Abb. 3.12). Jedoch ist der Defekt bei der Mutation in der sauren Domäne noch schwerwiegender (siehe Abb. 3.12). Es wurde bereits in Jermy et al., 2006, publiziert, dass bei einer Deletion des Brl-Bereichs 550-611 ein Defekt beider Importwege nach sich zieht (Jermy et al., 2006). Dies passt zu diesen Ergebnissen, da *sec63-404* zwei Mutationen in diesem Bereich hat (siehe Abb. 3.5). Ungewöhnlicherweise zeigten *sec63-404* saure Domäne und besonders *sec63-406* saure Domäne ebenfalls cotranslationale Importdefekte, wenn auch schwächer als die Defekte des posttranslationalen Importweges (siehe Abb. 3.12). Denn Sec62p wurde bisher nur eine Rolle beim posttranslationalen Import nachgewiesen (Wittke et al., 2000). Bei *sec63-406* ist die saure Domäne allein verantwortlich für den Importdefekt (siehe Abb. 3.12). Es scheint aber, dass durch Kombination mit den Mutationen in der Brl-Domäne der cotranslationale Importdefekt noch etwas verstärkt wird (siehe Abb. 3.12).

Im Gegensatz dazu ist in *sec63-405* der posttranslationale wie auch der cotranslationale Importdefekt auf die Mutation in der ersten Transmembrandomäne zurückzuführen (siehe

Abb. 3.12). Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Mutation, die Auswirkung auf die Konformation von Sec63p hat.

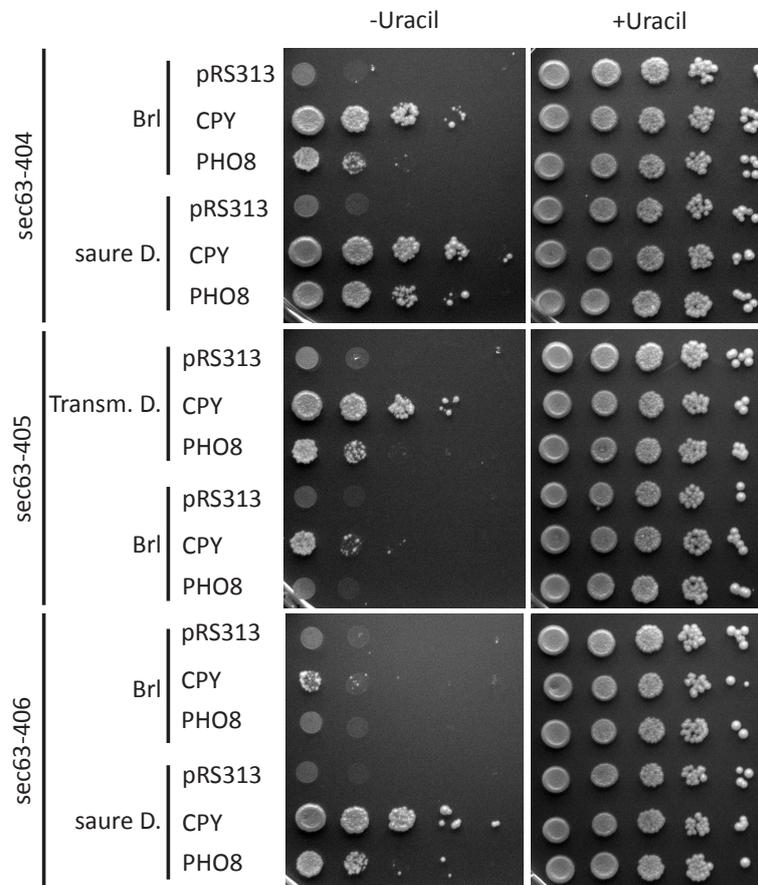


Abbildung 3.12: *In vivo* Protein-Import-Assay mit *sec63*-Mutanten mit vereinzelt Domänen

Die Konstrukte der Mutanten *sec63-404*, *sec63-405* und *sec63-406* mit vereinzelt Domänen wurden mit drei verschiedenen Plasmiden transformiert. 1. Ein Reporterplasmid für cotranslationalen Import pRS313-*PHO8-URA3*, 2. Ein Reporterplasmid für posttranslationalen Import pRS313-*CPY-URA3* und 3. Zur Kontrolle der leere pRS313-Vektor. Diese Stämme wurden anschließend auf Selektionsmedium ohne Histidin oder ohne Histidin und ohne Uracil zu  $10^5$  bis  $10^1$  Zellen aufgetropft. Die Platten wurden bei 30 °C für 3 Tage inkubiert.

## 3.3 Untersuchung der *sec63*-Mutanten auf UPR-Aktivität

### 3.3.1 Kreuzung der *sec63*-Mutanten mit einem $\Delta$ *Ire1*-Stamm

Ire1p ist ein Schlüsselprotein bei der UPR in Hefe (Shamu & Walter, 1996). Wenn es zu einer höheren Last an ungefalteten Proteinen oder Aggregaten in der Zelle kommt, wird Ire1p durch Autophosphorylierung aktiviert und spleißt die mRNA des Transkriptionsfaktors *HAC1*, der die Expressierung nachfolgender Proteine induziert, die durch UPR reguliert werden (Mori, 2009). Bei einer Deletion von *IRE1* kommt es zu einer erhöhten Stresssensitivität in der Zelle, die bei einer Kreuzung mit einem anderen Stamm, bei dem ein Protein im gleichen „Pathway“ deletiert oder mutiert ist, sogar noch erhöht ist gegenüber den Parentalstämmen, was zur synthetischen Letalität führen kann (Chen et al., 2005).

Tabelle 3.1: Übersicht über die Kreuzungen der *sec63*-Mutanten mit dem  $\Delta$ *Ire1*-Stamm

In dieser Tabelle sind die Stämme aufgeführt, die mit dem  $\Delta$ *Ire1*-Stamm KRY160 gekreuzt wurden. Da die meisten haploiden Stämme nach Sporulation nicht lebensfähig waren, sind noch die vitalen Kolonien der vereinzelt Tetraden angegeben, sowie die Zahl der Kolonien, die wachstumsfähig auf den jeweiligen Selektionsmedien waren. Die daraus resultierenden Genotypen sind angegeben.

Stamm	gewachsene Kolonien	Nourseothricin ( $\Delta$ <i>sec63</i> )	d/o TRP ( $\Delta$ <i>Ire1</i> )	d/o TRP + Nourseothricin ( $\Delta$ <i>Ire1</i> + $\Delta$ <i>sec63</i> )
wt (KRY875)	14 Kolonien von 44 Sporen	3	3	0
<i>sec63-401</i>	16 Kolonien von 36 Sporen	2	2	0
<i>sec63-402</i>	26 Kolonien von 40 Sporen	4	7	1
<i>sec63-405</i> Transm.	16 Kolonien von 38 Sporen	2	3	0
<i>sec63-404</i> Brl	10 Kolonien von 32 Sporen	1	2	0
<i>sec63-404</i> saure Domäne	6 Kolonien von 26 Sporen	1	2	0

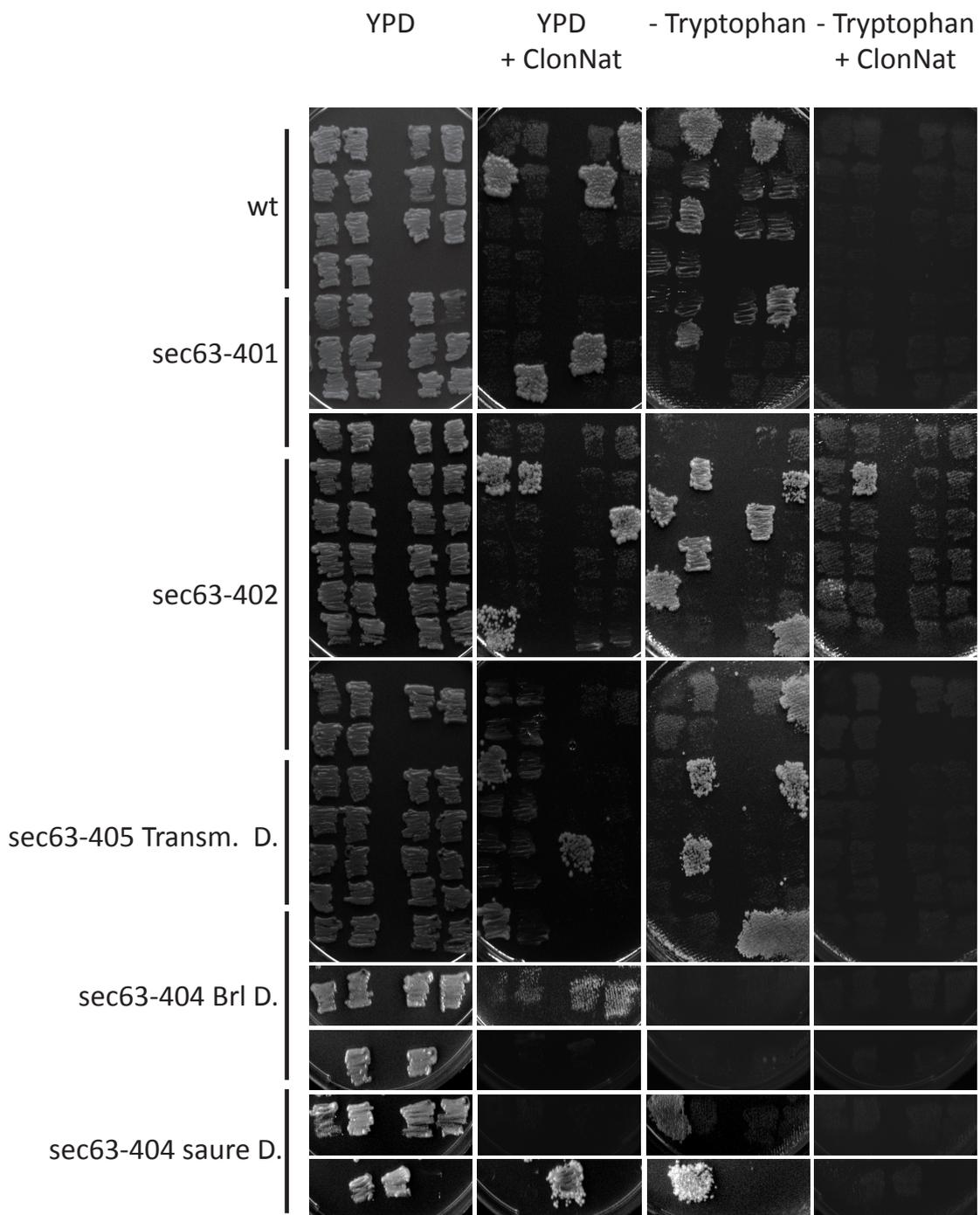


Abbildung 3.13: Kreuzung der *sec63*-Mutanten mit einem  $\Delta ire1$ -Stamm

Jeweils zwei haploide Stämme, die aus derselben Tetrade vereinzelt wurden, wurden paarweise nebeneinander ausgestrichen. Die Stämme wurden auf YPD und zur Selektion auf Nourseothricin (ClonNat; 100 µg/ml) für  $\Delta sec63$ , auf d/o Trp-Medium für  $\Delta ire1$  und auf d/o Trp mit Nourseothricin zur Kombination der beiden Marker ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2 Tage.

Aus diesem Grund habe ich die beiden DnaJ-Mutanten *sec63-401* und *sec63-402*, sowie die Mutanten *sec63-405* Transmembrandomäne, *sec63-404* Brl und *sec63-404* saure Domäne mit dem  $\Delta ire1$ -Stamm KRY160 gekreuzt, die erhaltenen diploiden Kreuzungen zur Sporulation eingesetzt und auf YPD-Platten vereinzelt (siehe Punkt 2.10.3 und Punkt 2.10.4). Die *sec63*-Mutanten und der Stamm KRY875, der zu ihrer Konstruktion verwendet wurde, tragen an der Stelle des *SEC63*-ORF die Sequenz des *natNT2*-Gens (siehe Punkt 2.8.5). Zur Deletion von *IRE1* wurde das *TRP1*-Gen verwendet. Deshalb kann man anhand dieser Marker die Stämme weitgehend auf ihren Genotyp testen. Die gewachsenen Sporen einer Tetrade wurden also auf Selektionsmedium inklusive Nourseothricin auf Deletion von *SEC63* und auf Selektionsmedium ohne Tryptophan auf Deletion von *IRE1* getestet. Ziel war es also einen haploiden Stamm zu finden, der auf Medium wächst, das beide Selektionsformen vereint.

Leider waren die verschiedenen Kreuzungen nach Sporulation und Vereinzlung der Tetraden nur sehr schlecht angewachsen. Es konnte keine vollständige Tetradenreihe isoliert werden. Meist waren nur eine Spore oder höchstens zwei Sporen angewachsen. Nur Hefestämme, bei denen mindestens zwei haploide Stämme einer Tetrade angewachsen waren, wurden weiterhin auf Selektionsmedium ausgestrichen.

Eine Übersicht über die Anzahl der wachstumskompetenten Stämme und die daraus weiter getesteten Stämme gibt die Tab. 3.1. Weiterhin sind alle paarweise ausgestrichenen haploiden Stämme, die jeweils aus derselben Tetrade stammen in Abb. 3.13 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Zellen die Kombination der beiden Deletionen nicht gut angenommen hatten. Nur ein Bruchteil der vereinzelt Stämme war anschließend angewachsen. Nach Untersuchung mit einem Durchlicht-Mikroskop konnte bei vielen Stämmen ein Zellhaufen aus 2-20 Zellen nachgewiesen werden. Also hatte anfangs noch Zellteilung stattgefunden, war aber nach wenigen Zyklen abgebrochen. Nur einmal konnte ein Stamm isoliert werden, der sowohl auf d/o Trp als auch mit Nourseothricin-Zusatz wachsen konnte (siehe Abb. 3.13). Dieser Stamm entstand aus der Kreuzung von *sec63-402* mit dem  $\Delta ire1$ -Stamm. Eine Aussage über den Einfluss der *IRE1*-Deletion auf die einzelnen *sec63*-Mutationen lässt sich hier aber aufgrund der nicht ausreichenden Daten nicht treffen.

### 3.3.2 UPR-Aktivität von *sec63-402* und *sec63-404*

Die Degradation von ERAD-Substraten ist immer eng mit der UPR verwoben (Friedlander et al., 2000). Dabei wird in der Hefe die Expression verschiedener Proteine aktiviert, die bei der Degradation und Faltung von Proteinen assistieren (Friedlander et al., 2000). Die Expression dieser Proteine wird durch die gespleißte Form des Transkriptionsfaktors Hac1p

aktiviert, der an das UPRE bindet, welches vor diese Proteine geschaltet ist (Mori et al., 1992; Cox et al., 1993). Für diesen Versuchsansatz wurde, wie unter Punkt 2.10.6 beschrieben, ein Reportersystem verwendet, bei dem das UPRE von *KAR2* mit einem defekten *CYC1* Promotor vor das *LacZ*-Gen geschaltet ist. Bei UPR-Aktivierung wird  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, welche ein Substrat umsetzen kann, dass danach durch eine messbare Farbreaktion detektiert werden kann. Bei Fehlen des UPRE ist das Gen inaktiv.

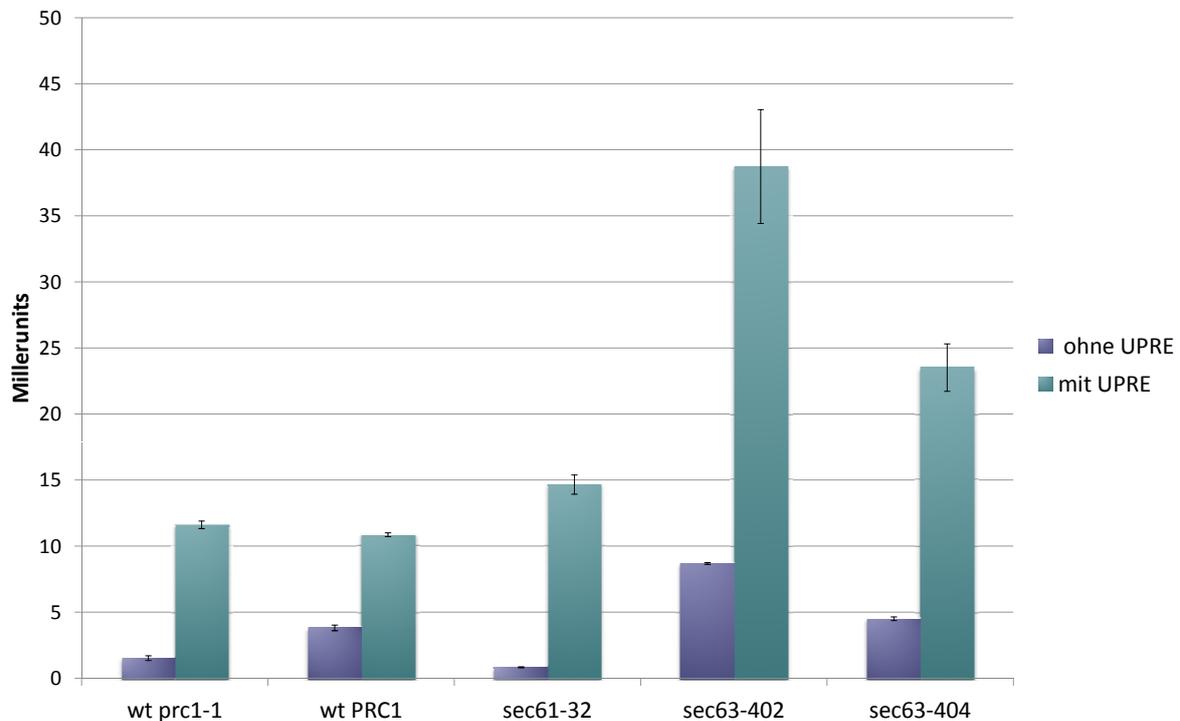


Abbildung 3.14: UPR-Reporter-Assay mit *sec63-402* und *sec63-404*

Die Stämme *sec63-402* und *sec63-404* wurden mit pJC30 (kein UPRE) und mit pJC31 (mit UPRE) transformiert. Die beimpften Flüssigkulturen wurden bis etwa  $OD_{600}=0,5$  bei 30 °C inkubiert und mit Chloroform und SDS behandelt. Die Reaktion wurde mit ONPG gestartet und bei 28 °C für 20 min inkubiert. Abgestoppt wurde durch Zugabe von  $Na_2CO_3$ . Die Wildtyp-Stämme KRY875 (*SEC63-URA3-pRS316*, *prc1-1*) und C6 (*SEC63-URA3-pRS316*, *PRC1*) wurden als Negativkontrolle verwendet, als Positivkontrolle diente der Stamm *sec61-32* (*PRC1*). Die Mittelwerte aus 2 Experimenten wurden verwendet, Standardabweichungen sind angegeben.

Wie in Abb. 3.14 dargestellt ist, ist die UPR-Aktivität in *sec63-402* etwa um ein 4faches im Vergleich mit den Wildtyp erhöht. In *sec63-404* ist ebenfalls eine erhöhte Aktivität feststellbar, aber nicht ganz so stark wie in *sec63-402* (etwa 1,5fach höher als wt; siehe Abb. 3.14). Zur Kontrolle wurde der übliche Wildtyp mit dem CPY\* Allel mitgeführt (*SEC63-URA3-pRS316*, *prc1-1*). Da aber dieser Stamm ebenfalls eine leicht erhöhte UPR-Aktivität

zeigt, wurde zusätzlich ein zweiter Wildtyp-Stamm mit dem wildtypischen *PRC1*-Allel (C6, siehe Abb. 3.1) getestet, um auszuschließen, dass die Anwesenheit von CPY\* zu erhöhter UPR-Aktivität führt. Als Positivkontrolle diente der Protein-Import-defekte Stamm *sec61-32*, der einen Aminosäureaustausch in der vierten Transmembrandomäne an der Stelle 150 von Cystein zu Tyrosin trägt und der *sec61*-Stamm mit der bisher höchsten UPR-Aktivität ist (Pilon et al., 1997; Römisch, 1999). Diese Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp KRY875 jedoch nur eine leichte UPR-Aktivität (siehe Abb. 3.14). Das maximale Stresspotential dieser Stämme wurde durch Tunicamycinzugabe zu den Übernachtskulturen getestet (siehe 2.10.6). Es konnte nach 2 h Tunicamycin-Behandlung etwa 4,5fache Aktivität des Wildtyps festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), was bedeutet, dass *sec63-402* eine beinahe maximale UPR-Antwort zeigt. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression des UPR-Proteins Kar2p in *sec63-402*, das eine Punktmutation in der Interaktionsdomäne mit Kar2p hat, erhöht ist. Diese erhöhte UPR-Aktivität lässt auf eine gestörte Proteinhomöostase in *sec63-402* schließen.

### 3.4 ERAD in den neuen *sec63*-Mutanten

Die *sec63*-Mutanten habe ich im Folgenden hinsichtlich ihres ERAD mit verschiedenen ERAD-Substraten getestet. Dabei wurden Substrate gewählt, die sich bezüglich ihrer Löslichkeit, ihres Importweges und ihrer  $t_{1/2}$  unterscheiden (siehe Tab. 3.2). Abb. 3.15 gibt eine Übersicht über ihre Topologie und über ihre Position in Bezug auf die Membran des ER.

Tabelle 3.2: Überblick über die Charakteristika der ERAD-Substrate

Diese Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten ERAD-Substrate, deren Importweg, Löslichkeit,  $t_{1/2}$  und den ERAD-Weg.

ERAD-Substrat	Importweg	Transmembrandomänen	$t_{1/2}$	ERAD-Weg
CPY*	post	0	20 min	ERAD-L
Deg1:Sec62 <sup>ProtA</sup>	co	2	13 min	i. d. R. über Hrd1
KHN	post/co	0	35 min	ERAD-L
KWW	post/co	1	35 min	ERAD-L
Sec61-2p	co	10	12 min	ERAD-M

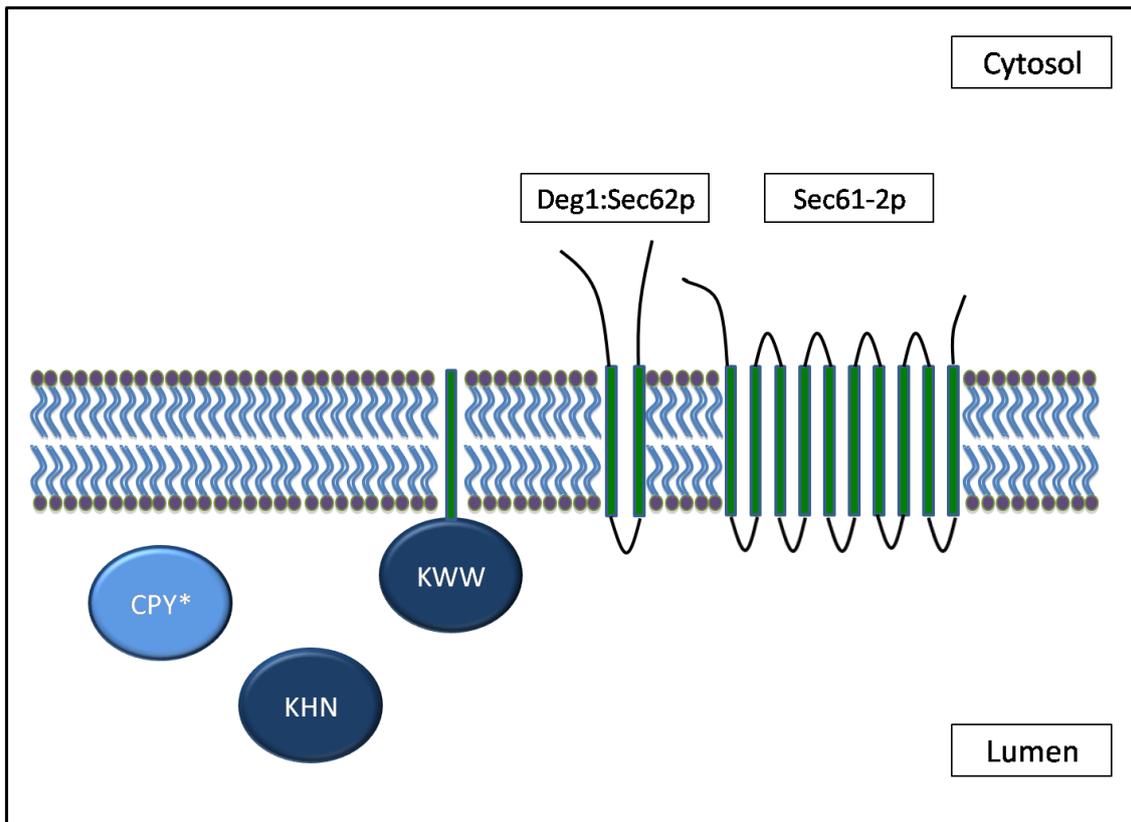


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der ERAD-Substrate

Gezeigt sind die löslichen ERAD-Substrate CPY\* und KHN, sowie die transmembranen Substrate KWW, Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> und Sec61-2p. Die luminalen ERAD-Substrate oder ERAD-Domänen sind in blauen gefüllten Kreisen dargestellt, die Transmembrandomänen in grün. Die jeweilige Lokalisation in Bezug auf die Membran des ER und ihre Topologie sind angezeigt.

### 3.4.1 ERAD von CPY\*

#### 3.4.1.1 ERAD von CPY\* in den neuen *sec63*-Mutanten

Die in Abb. 3.6 beobachtete Stabilisierung des ERAD-Substrats CPY\* habe ich zur Verifizierung des Effekts weitergehend untersucht (siehe Punkt 2.9.10). Als Substrat wurde die bereits erwähnte mutierte Form der Carboxypeptidase Y (CPY\*) verwendet (siehe 2.10.5). Bei der nicht mutierten Präproform von CPY ist eine 20 AS Signalsequenz und ein 91 AS Propeptid vor ein 431 AS großes Hauptprotein geschaltet (Jung et al., 1999). Nach posttranslationalen Import in das ER-Lumen wird die Signalsequenz abgespalten und an das Protein werden an vier Asparaginen (an den Stellen 13, 87, 138 und 368) N-glykosidisch Zuckerreste gebunden (Jung et al., 1999). Dadurch wird die sogenannte p1-Form gebildet, die ein Molekulargewicht von 67 kDa aufweist (Jung et al., 1999). Anschließend erfolgt im Golgi-Apparat eine weite-

re Modifikation der Glykosylierungsstellen, wobei die 69 kDa große p2-Form entsteht (Jung et al., 1999). Durch proteolytische Spaltung wird die Proregion in der Vakuole entfernt und das 61 kDa große, reife Protein wird gebildet (Finger et al., 1993; Jung et al., 1999). Bei der CPY\*-Mutante gelangt das Protein nur in das ER-Lumen und wird anschließend dem ERAD zugeführt, so dass keine p2 oder reife Form vorhanden ist (Finger et al., 1993).

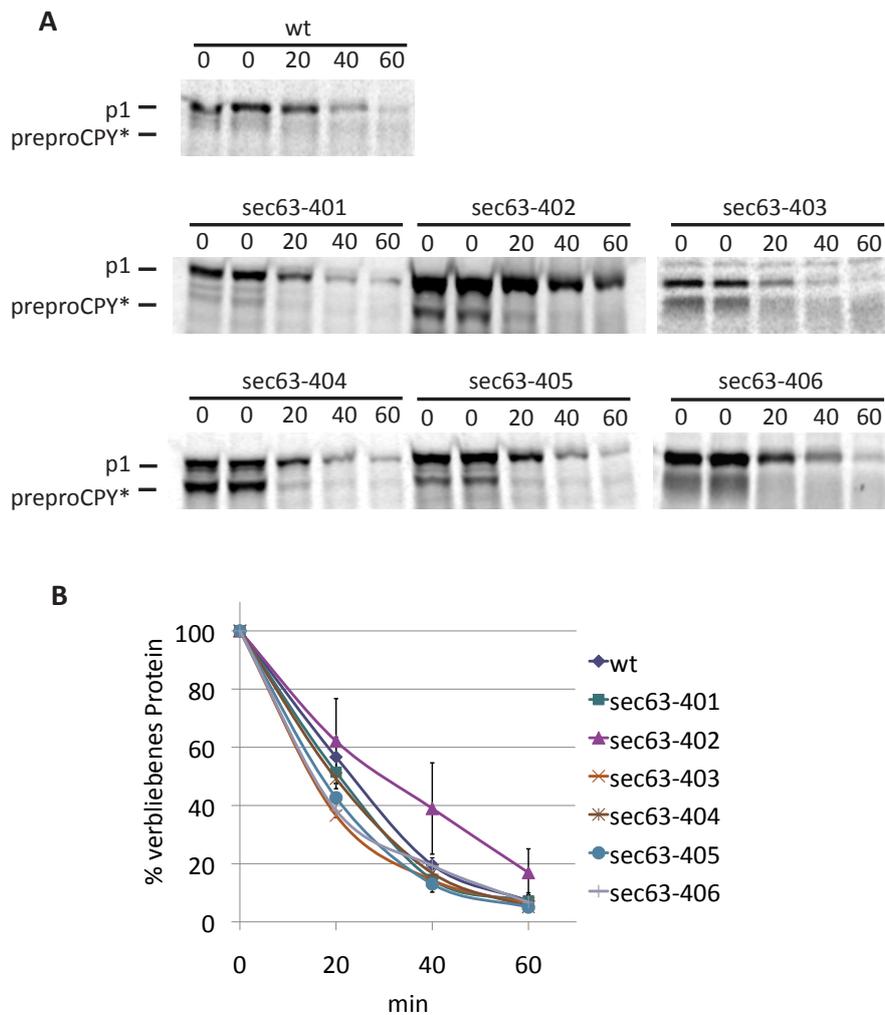


Abbildung 3.16: ERAD von CPY\* in den neuen *sec63*-Mutanten

**A:** Die neuen *sec63*-Mutanten wurden mit Pulse-Chase mit dem ERAD Substrat CPY\* getestet. Die Zellen wurden auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l eingestellt. Die Kulturen wurden 20 min lang gehungert und 2 min mit  $^{35}$ S-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt und der gefällte Überstand mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. Als wt wurde KRY875 verwendet. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 3-4 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Als Methode wurde der Pulse-Chase verwendet, um die Degradationszeiten der einzelnen Stämme für dieses Substrat zu testen (siehe Punkt 2.9.10). Alle *sec63*-Mutanten, inklusive dem wildtypischen Stamm KRY875 zur Kontrolle, wurden, wie unter Punkt 2.9.10 beschrieben, mit radioaktivem Methionin und Cystein markiert, welches nach einer zwei-minütigen Labeling-Zeit mit einem Überschuss an unmarkiertem Methionin/Cystein kompetiert wurde. Die Proben wurden nach unterschiedlichen Zeiten gestoppt, aufgeschlossen und mit einem Antikörper gegen CPY, an Protein A-Sepharose gebunden, gefällt. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer inklusive 200 mM DTT eluiert, auf ein Protein-Gel aufgetragen und mittels Autoradiographie detektiert (siehe Punkt 2.9.10).

Die Stabilisierung von CPY\* in der Mutante *sec63-402* konnte mittels Pulse-Chase, wie in Abb. 3.16 zu sehen, bestätigt werden. Die  $t_{1/2}$  war in dieser Mutante von etwa 20 min auf ungefähr 30 min erhöht (siehe Abb. 3.16). Alle anderen Mutanten zeigten keinen langsameren ERAD von CPY\* (siehe Abb. 3.16). Außerdem konnte man den Import-Defekt verschiedener Mutanten nachweisen: Die cytosolische präpro-Form von CPY\* konnte deutlich in den Mutanten *sec63-402*, *sec63-404* und *sec63-405* nachgewiesen werden und in schwächerer Form ebenfalls in *sec63-403* und *sec63-406* (siehe Abb. 3.16). Obwohl mehrere Mutanten einen Import-Defekt aufweisen, konnte nur für *sec63-402* auch ein verlangsamter ERAD gezeigt werden.

#### **3.4.1.2 ERAD von CPY\* in *sec63-201***

Den ERAD von CPY\* habe ich ebenfalls in *sec63-201* und dem passenden Wildtypstamm DNY54 untersucht. Wie bereits erwähnt, hat diese Mutante eine Deletion der letzten 27 Aminosäuren in ihrem C-Terminus, wodurch eine Interaktion mit Sec62p und damit der posttranslationale Protein-Import verhindert wird (Ng et al., 1996). Dadurch gelangt nur ein minimaler Anteil des posttranslational importierten CPY\* in das ER-Lumen, wie in Abb. 3.17 an der schwachen Bande der p1-Form zu erkennen ist. Dadurch wird die Auswertung und Interpretation der Daten erschwert. Es scheint jedoch, als ob die schwache Bande der p1-Form langsamer abgebaut wird, als im dazugehörigen Wildtyp dessen  $t_{1/2}$  mit etwa 27 min im Bereich der Literaturwerte liegt (Finger et al., 1993).

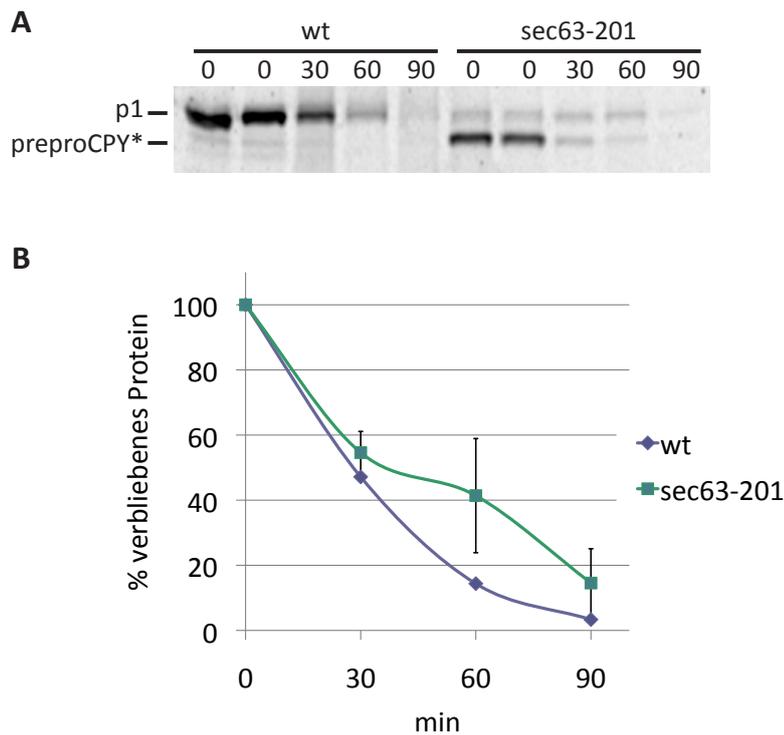


Abbildung 3.17: ERAD von CPY\*-HA in *sec63-201*

**A:** Die Mutante *sec63-201* mit dem Wildtyp-Stamm DNY54 wurde mit Pulse-Chase auf CPY\*-HA-ERAD getestet. Dafür wurden die Stämme mit pDN436 (CPY\*-HA) transformiert. Die Stämme wurden bei 30 °C über Nacht bis zur frühen logarithmischen Phase angezogen, auf  $OD_{600}=1$  in 250  $\mu$ l Label-Medium eingestellt und anschließend für 20 min gehungert und 5 min mit <sup>35</sup>S-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt und der gefällte Überstand wurde mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert.

**B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.4.1.3 ERAD von CPY\* in *sec63*-Mutanten nach Vereinzelung der Domänen

Die Konstrukte, unter Punkt 3.2.1.2 vorgestellt, wurden auf unterschiedliche CPY\*-ERAD-Zeiten getestet. Dies wurde für die Mutanten *sec63-405* und *sec63-406* untersucht, sowie die aus diesen Stämmen hervorgegangenen Mutanten, deren Punktmutationen nach der Lokalisierung in den einzelnen Domänen getrennt wurden (siehe Punkt 3.2.1.2).

#### 3.4.1.3.1 CPY\*-Degradation in *sec63-405* nach Vereinzelung der Domänen

Die Mutante *sec63-405* und deren vereinzelte Transmembran- und Brl-Domäne wurden zum ERAD von CPY\* eingesetzt, um einen möglichen Unterschied der Vollmutante in Bezug auf

ihre einzelnen Punktmutationen zu untersuchen. Wie bereits zuvor, ist bei der Vollmutante ein leichter Importdefekt zu erkennen (siehe Abb. 3.18). Dieser konnte bereits im *in vivo* Protein-Import-Assay auf die Mutation in der ersten Transmembrandomäne zurückgeführt werden (siehe Abb. 3.12) und wurde auch hier mit dem Pulse-Chase bestätigt. Nur bei der vereinzelt Transmembrandomänen-Mutante ist ebenfalls ppCPY\* zu erkennen, bei der Brl-Mutante jedoch nicht (siehe Abb. 3.18). Die Degradationsgeschwindigkeiten des CPY\* sind allerdings, wie schon für die Vollmutante gezeigt, ähnlich dem Wildtyp-Stamm (siehe Abb. 3.16).

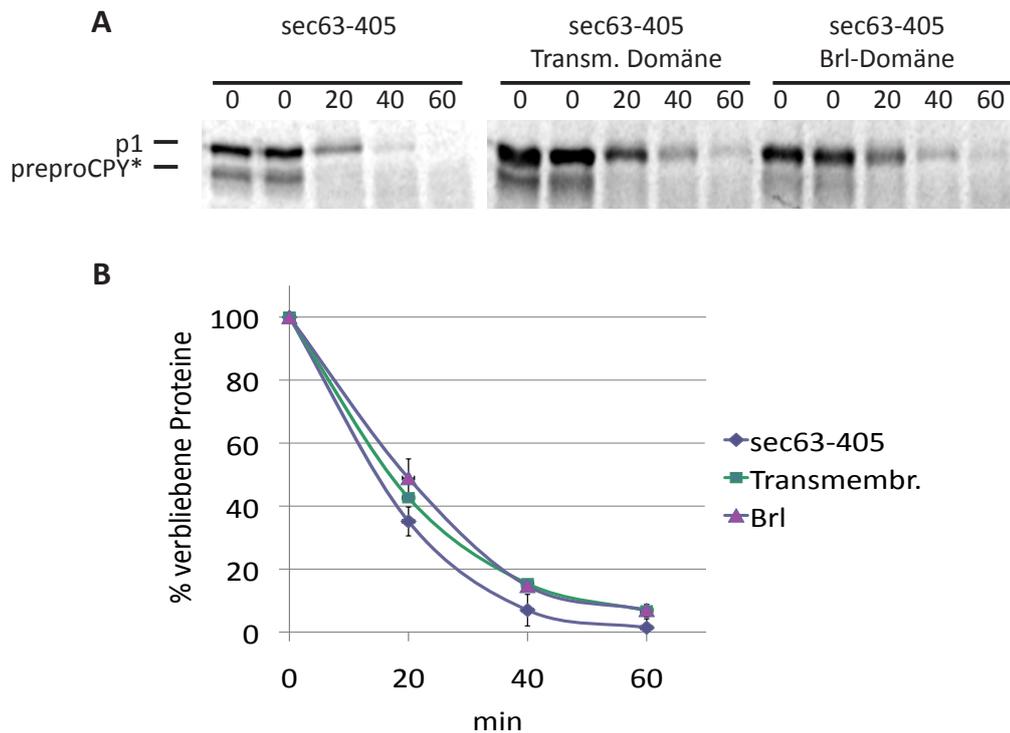


Abbildung 3.18: ERAD von CPY\* in *sec63-405* mit vereinzelt Domänen

**A:** Die Mutante *sec63-405* sowie die Konstrukte mit vereinzelt Domänen dieser Mutante wurde mit Pulse-Chase auf CPY\*-ERAD getestet. Die Stämme wurden auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l eingestellt. Die Kulturen wurden 20 min lang gehungert und 2 min mit  $^{35}S$ -Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### **3.4.1.3.2 ERAD von CPY\* in vereinzelt Domänen von *sec63-406* unter Stress-temperatur**

In der Mutante *sec63-406* wurde, wie in Abb. 3.7 dargestellt, ein Wachstumsdefekt bei erhöhten Temperaturen beobachtet. Dieser konnte nach Vereinzelung der Brl und sauren Domäne von *sec63-406* genauer bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Mutationen in der sauren Domäne eine höhere Temperatursensitivität verursachen als die Mutationen in der Brl-Domäne (siehe Abb. 3.9). Deshalb wurde neben der Vollmutante *sec63-406* zusätzlich die Stämme mit vereinzelt Domänen in einem Pulse-Chase-Experiment hinsichtlich ERAD von CPY\* bei der Stresstemperatur 35 °C untersucht.

Dazu wurden die Kulturen ab dem 20 minütigen „Hunger-Schritt“ bei 35 °C inkubiert bzw. zur Kontrolle bei 30 °C. Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, erscheint das Ergebnis vergleichbar wie in Abb. 3.16 gezeigt. Die Mutante *sec63-406* wie auch die Stämme mit vereinzelt Domänen degradieren bei 30 °C zwar ein wenig schneller als der Wildtyp, die ERAD-Geschwindigkeiten nähern sich aber im Verlauf des Chases an. Möglicherweise ist die UPR in *sec63-406*, *sec63-406* Brl und *sec63-406* saure Domäne erhöht, was den CPY\*-ERAD beschleunigen könnte. Alle Mutationsstämme liegen dicht beieinander (siehe Abb. 3.19).

Bei der Inkubation bei 35 °C liegen alle Stämme von Anfang an in ihren Degradationsraten sehr nahe beieinander (siehe Abb. 3.19). Durch die erhöhte Temperatur kann davon ausgegangen werden, dass im Wildtyp die UPR aktiviert wurde, was die CPY\*-ERAD-Geschwindigkeit damit an die *sec63-406*-Mutanten angenähert hat. Nur der Stamm mit Mutationen in der Brl-Domäne ist, zumindest am Anfang des Experiments, ein wenig schneller als die anderen Stämme (siehe Abb. 3.19). Allerdings ist auch hier der geringe Unterschied nur am Anfang des Pulse-Chase-Experiments zu beobachten. Auch bei Inkubation von 35 °C ist keine Stabilisierung von CPY\* in *sec63-406* oder den Vereinzelungsstämmen zu sehen (siehe Abb. 3.19).

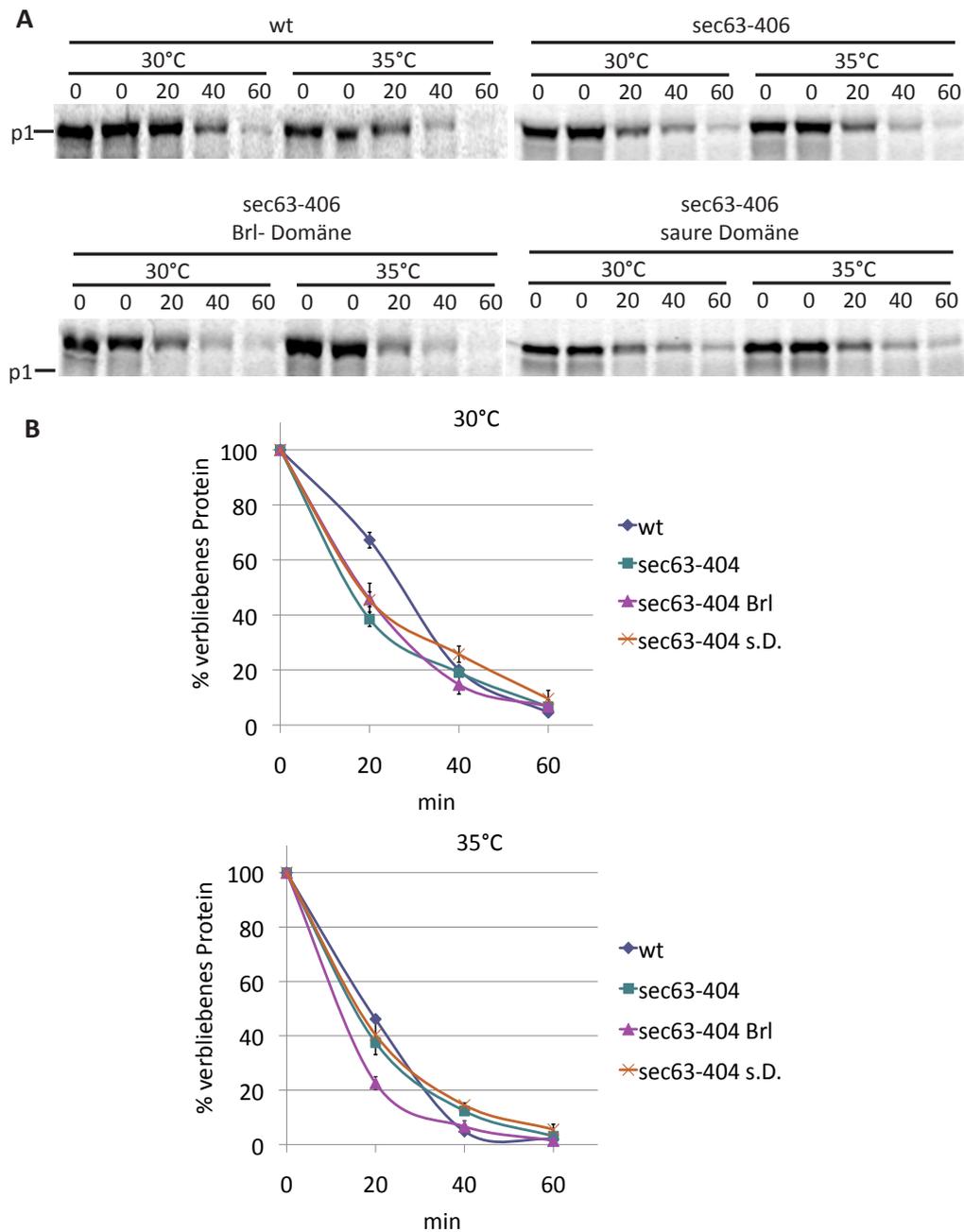


Abbildung 3.19: ERAD von CPY\* in vereinzelt Domänen von *sec63-406* bei 30 °C und 35 °C

**A:** Die vereinzelt Domänen (Brl- und saure Domäne) der Mutante *sec63-406* sowie die Vollmutante und der wildtypische Stamm KRY875 wurden mit Pulse-Chase auf CPY\*-ERAD getestet. Die Stämme wurden auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l eingestellt. Die Kulturen wurden 20 min lang gehungert und 2 min mit radioaktivem S-35 markiertem Met/Cys gelabelt. Der Chase mit nicht radioaktivem Met/Cys wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand auf einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurde der Mittelwert aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

#### 3.4.1.4 ERAD von CPY\* in *sec63-402* bei 23 °C und 37 °C

Die in den Wachstumsexperimenten beobachtete Stabilisierung von CPY\* in der Mutante *sec63-402* wurde nun unter Kälte- und Hitzetemperaturen genauer untersucht (siehe Punkt 3.7). Bereits in der Publikation von Nishikawa et al., 2001, konnte ein stärkerer Effekt durch diese extremen Temperaturen hervorgerufen werden (Nishikawa et al., 2001). In dieser Publikation wurde ERAD von CPY\* und einer Mutante des Hefe-Pheromons  $\alpha$ -Faktor, die keine Glykosylierungsstellen besitzt ( $\Delta$ gp $\alpha$ ), in Abhängigkeit der DnaJ-Domänen Proteine Jem1p, Scj1p und Sec63p untersucht (Nishikawa et al., 2001). Dazu wurde die *sec63*-Mutante, *sec63-1* verwendet. Diese zeigte nur einen minimalen Effekt. Die beiden anderen ER-luminalen DnaJ-Domänen Proteine, Jem1p und Scj1p, zeigten vor allem bei Doppeldeletion einen ERAD-Defekt für beide Substrate (Nishikawa et al., 2001).

Deshalb habe ich im Folgenden die CPY\*-ERAD in der neu-identifizierten DnaJ-Mutante *sec63-402* bei 23 °C und 37 °C untersucht. Als Wildtyp wurde ein KRY875-Äquivalent verwendet, in welcher das *wtSEC63*-Gen in dem *LEU2*-pRS315-Vektor inkloniert ist, anstatt in den *URA3*-pRS316-Vektor. Der Wildtyp zeigte bei 23 °C eine  $t_{1/2}$  von etwa 44 min und bei 37 °C bei 18 min (siehe Abb. 3.20). Diese Werte stimmten mit den  $t_{1/2}$  in der Publikation von Nishikawa überein (Nishikawa et al., 2001). Die *sec63-402*-Mutante zeigte jedoch bei 23 °C eine Verdoppelung der  $t_{1/2}$  auf etwa 86 min (siehe Abb. 3.20). Ein Effekt bei 37 °C ist jedoch kaum erkennbar (siehe Abb. 3.20).

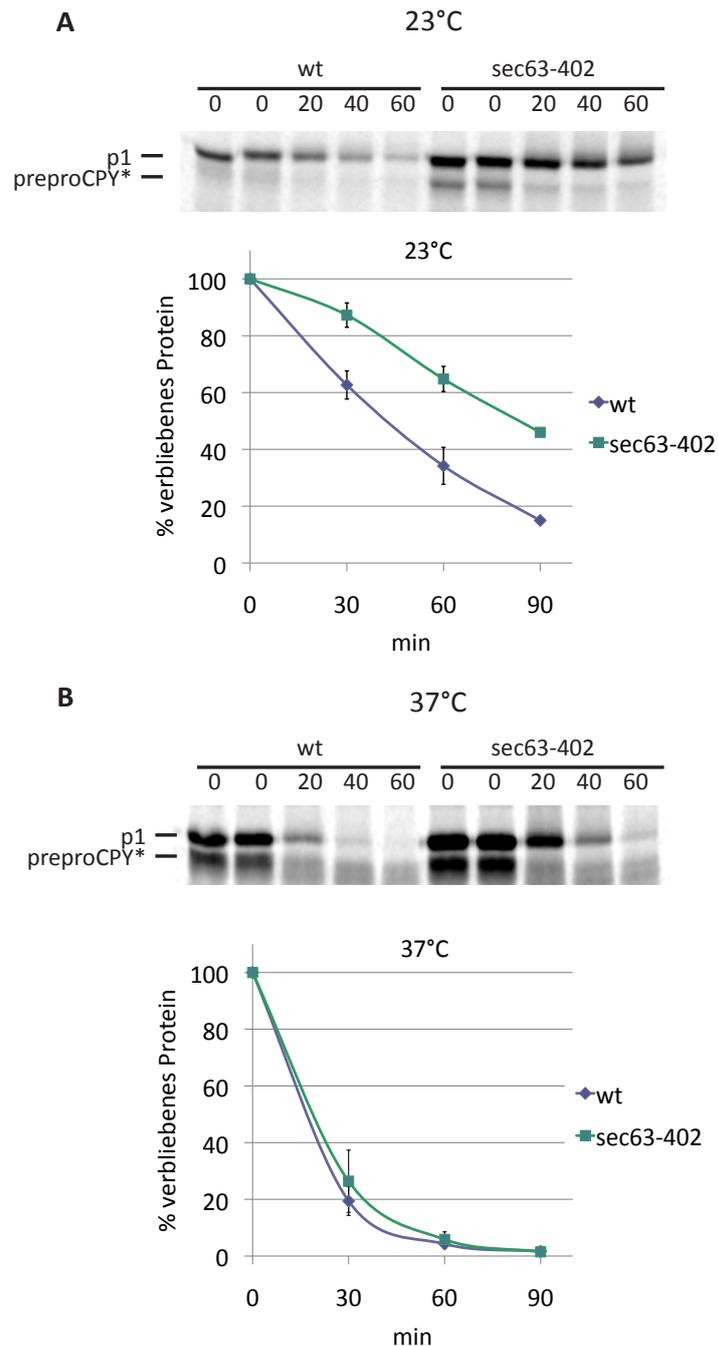


Abbildung 3.20: ERAD von CPY\* bei 23 °C und 37 °C in *sec63-402*

Der *wtSEC63-LEU2*-Stamm KRY949 und *sec63-402* wurden mit Pulse-Chase auf CPY\*-ERAD getestet. Die Stämme wurden bei 30 °C über Nacht bis zur frühen logarithmischen Phase angezogen, auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l Label-Medium eingestellt und anschließend bei 23 °C bzw. 37 °C inkubiert. Es wurde 20 min lang gehungert und 2 min mit  $^{35}S$ -Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. Graphische Darstellung der Degradationskurven im unteren Bildteil. Es wurden Mittelwerte aus 3 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben. Der Versuchsteil bei 23 °C ist in **A** gezeigt, bei 37 °C in **B**.

### 3.4.1.5 ERAD von CPY\* in *sec63-402* mit einer Minute Labeling-Zeit

Es sollte im Weiteren sichergestellt werden, dass der Stamm innerhalb der zwei Minuten Labeling-Zeit nicht bereits ein Teil des gelabelten Substrats degradiert. Deshalb habe ich im Folgenden die Labeling-Zeit auf eine Minute verkürzt. Wie in Abb. 3.21 dargestellt, sieht man hier noch deutlicher als in Abb. 3.16, dass der verlangsamte ERAD besser im späteren Verlauf der Degradationskurve zu sehen ist (siehe Abb. 3.16 B). Eine längere  $t_{1/2}$  als in Abb. 3.16 ist aber nicht zu sehen.

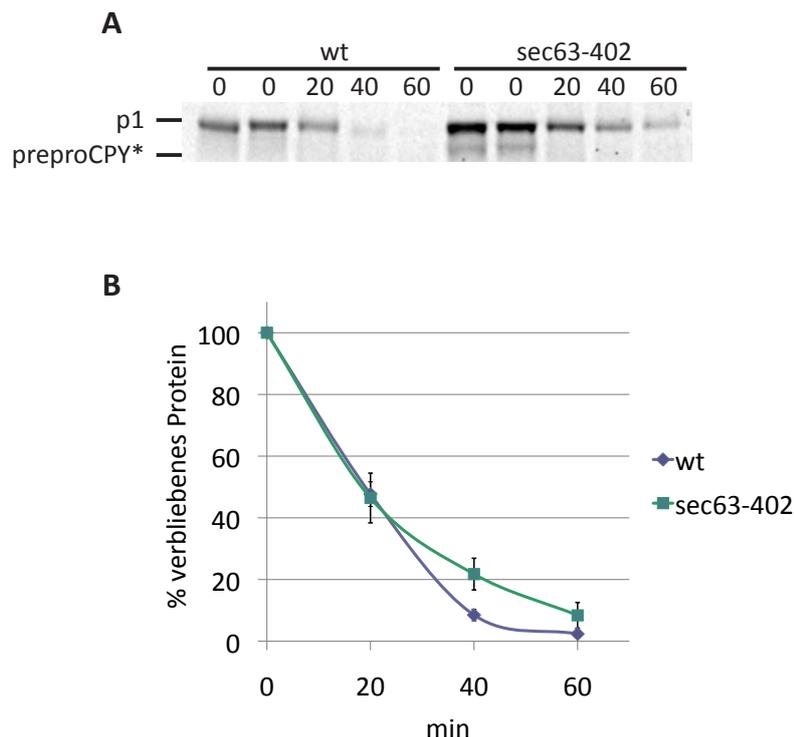


Abbildung 3.21: ERAD von CPY\* bei 1 min Labeling-Zeit in *sec63-402*

**A:** Der *wtSEC63-LEU2*-Stamm und *sec63-402* wurden mit Pulse-Chase auf CPY\*-ERAD getestet. Die Stämme wurden bei 30 °C über Nacht bis zur frühen logarithmischen Phase angezogen, auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l Label-Medium eingestellt und anschließend 20 min lang gehungert und 1 min mit S35-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.4.1.6 CPY\*-Degradation bei Überexpression von Sec63p

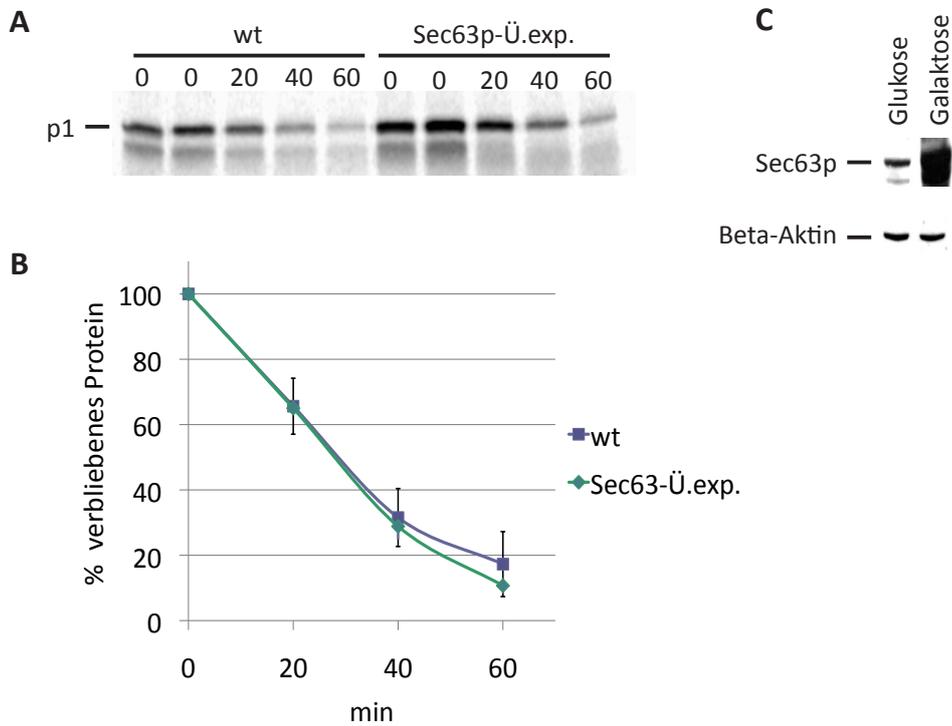


Abbildung 3.22: ERAD von CPY\* mit überexprimiertem Sec63p

**A:** Der *wtSEC63-LEU2*-Stamm wurde mit Pulse-Chase auf CPY\*-ERAD untersucht. Dafür wurde er mit dem *Gal-SEC63-pRS314* Plasmid transformiert. Von einer gemeinsamen Kolonie wurde je eine Vorkultur mit d/o Trp-Medium mit 2% Glukose bzw. 2% Raffinose beimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Mit der Glukose-Kultur wurde eine 25 ml Kultur d/o Trp-Medium und 2% Glukose beimpft, die Raffinose-Kultur wurde in d/o Trp mit 2% Galaktose und 2% Sucrose überimpft zur Induktion des Gal-Promotors. Diese Kulturen wurden bei 30 °C über Nacht bis zur frühen logarithmischen Phase angezogen und auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l Label-Medium (mit Glukose oder Galaktose/ Sucrose) eingestellt. An dieser Stelle wurden  $OD_{600}=6$  jeder Kultur entnommen, abzentrifugiert, aufgeschlossen und mittels Western Blot auf die Überexpression hin untersucht. Die Kulturen wurden 20 min lang gehungert und 2 min mit 35S-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben. **C:**  $OD_{600}=0,4$  der entnommenen Proben wurden auf ein 10% iges Gel aufgetragen und gegen  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle und gegen Sec63p gefärbt.

Weitergehend habe ich untersucht, ob Sec63p bei einer Überexpression einen Effekt auf ERAD von CPY\* zeigt. Dafür wurde in den *wtSEC63-LEU2-pRS315*-Stamm ein Plasmid durch LiAc-Transformation eingebracht, auf dem *SEC63* unter der Kontrolle eines *Gal1*-

Promotors steht. Über Nacht wurde dieser Promotor durch 2% Galaktose induziert und vor dem Start des Pulse-Chase zusätzlich eine Probe der Kultur entnommen und per Western Blot auf die Überexpression von Sec63p getestet. Als Ladekontrolle wurde gegen  $\beta$ -Aktin gefärbt. Nach Quantifizierung mit dem Programm „Image Lab“ konnte eine 6-fache Überexpression von Sec63p festgestellt werden (siehe Abb. 3.22). Im Pulse-Chase-Experiment wurde CPY\* bei dieser Überexpression jedoch nur minimal schneller degradiert (siehe Abb. 3.22). Dieser geringe Unterschied beider Effekte kann leider nicht zu einer eindeutigen Aussage herangezogen werden.

#### 3.4.1.7 ERAD von CPY\* mit depletiertem Sec63p

Zum Test des ERAD von CPY\* in einem Sec63p-depletiertem Stamm wurde der Stamm BYY5 aus der Gruppe von Colin Stirling verwendet (Young et al., 2001). In diesem Stamm steht das *SEC63*-Gen unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors, der durch Zugabe von Methionin zu einer Endkonzentration von 2 mM im Medium inhibiert wird, wodurch die Expression von Sec63p zum Erliegen kommt (Young et al., 2001).

Wie in der Publikation von Young et al., 2001 beschrieben, ist nach etwa 7 h Inkubation mit Methionin Sec63p zum Großteil depletiert. In diesem Experiment wurde nach Ablauf der 7 h ein Pulse-Chase nach demselben Protokoll durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ebenfalls eine Probe ohne Methionin im Pulse-Chase und im Western Blot mitgeführt. Dabei konnte eine Verringerung des Sec63p-Gehaltes um etwa die Hälfte ermittelt werden (siehe Abb. 3.23 C). Dies war nicht so effizient wie in der Publikation von Young et al., 2001. Jedoch kommt es durch die Depletion von Sec63p zu einem co- und posttranslationalen Importdefekt, was anhand der Substrate CPY und DPAB gezeigt werden konnte (Young et al., 2001). Dies passt zu den Beobachtungen in meinem Experiment, wo ebenfalls nur ein geringer Teil des CPY\* in das ER importiert wurde (siehe Abb. 3.23 A). Die Degradation dieser kleinen Menge CPY\* verläuft etwas langsamer als ohne Methionin-Zugabe (siehe Abb. 3.23 A und B).

Der Proteingehalt dieses Stammes ist aber generell stark vermindert, wie auch anhand der  $\beta$ -Aktin Färbung zu erkennen ist (siehe Abb. 3.23 C). Deshalb kann eine allgemeine Funktionsstörung dieses Stammes nicht ausgeschlossen werden und der beobachtete ERAD-Defekt, sollte nicht nur auf die Sec63p-Verminderung zurückgeführt werden.

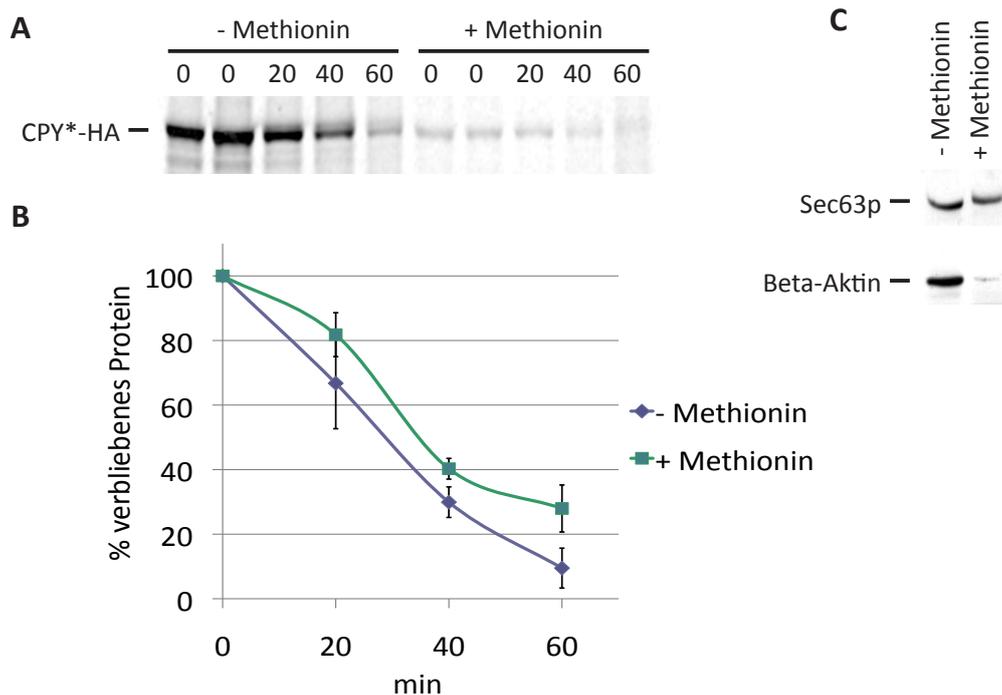


Abbildung 3.23: ERAD von CPY\* mit depletiertem Sec63p

Es wurde der Stamm BYY5 im Pulse-Chase verwendet, der mit HA-getagtem CPY\* transformiert wurde (pDN436). Das *SEC63*-Gen liegt in diesem Stamm unter der Kontrolle des *MET3*-Promoters, der durch 2 mM Methionin inhibiert wird. **A:** Ab einer  $OD_{600}=0,5$  wurde Methionin in das Kulturmedium zugegeben und der Stamm weitere 7 h inkubiert. Anschließend wurde eine Probe zum Test des Proteingehalts entnommen und ein Pulse-Chase durchgeführt. Dabei wurden die Kulturen auf  $OD_{600}=1,5$  in 250  $\mu$ l Label-Medium eingestellt und anschließend 20 min lang gehungert. Die Kulturen wurden 2 min lang mit  $^{35}S$ -Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand auf einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. Es wurde zusätzlich eine Kontrollprobe ohne Methionin-Zugabe getestet. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben. **C:** Die entnommenen Zellproben wurden mittels Glasperlen aufgeschlossen und mit Western Blot und Immunfärbung gegen Sec63p weiter analysiert. Dafür wurden  $OD_{600}=0,4$  der entnommenen Proben und ein 10% iges Gel verwendet. Eine zusätzliche Färbung gegen  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

### 3.4.2 ERAD des Transmembranproteins Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup>

Als Beispiel für ein transmembranes ERAD-Substrat wurde Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> gewählt (siehe Abb. 3.24). Dabei handelt es sich um ein Derivat von Sec62p, an dessen N-Terminus eine Deg1-Sequenz angefügt wurde, um es dem ERAD-Weg zuzuführen (Mayer et al., 1998). Dieses Substrat hat zwei Transmembrandomänen, die durch eine kurze, ER-luminale Schleife

miteinander verbunden sind. Der C- und N-Terminus dieses Proteins befinden sich im Cytosol (Mayer et al., 1998). Das Substrat trägt am C-Terminus einen Protein A-Tag, ist im Proteingel bei etwa 70 kDa nachzuweisen und die  $t_{1/2}$  liegt bei ungefähr 13 min (Mayer et al., 1998; Scott & Schekman, 2008). Überraschenderweise gelangt der N-Terminus des Substrates bei dem ERAD in den ER-luminalen Bereich (Scott & Schekman, 2008). Dabei erfolgt eine N-Acetylierung an dem Asparagin an der Stelle 153, weshalb im Western Blot auch eine Doppelbande zu sehen ist. Die Deg1-Sequenz führt das Substrat normalerweise dem Doa10-Weg zu, doch dieses synthetische ERAD-Substrat wird in der Regel über den Hrd1-Weg degradiert (Rubenstein et al., 2012).



Abbildung 3.24: Schematische Darstellung von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup>

Hier ist das ERAD-Substrat Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> gezeigt. Dabei handelt es sich um eine abgewandelte Form von Sec62p vor dessen N-Terminus eine Deg1-Sequenz kloniert ist. Die langen N- und C-Termini des Konstrukts befinden sich im Cytosol und sind über eine kurze ER-luminale Schleife miteinander verbunden. Außerdem ist C-terminal ein Protein A-Tag angefügt (aus Mayer et al., 1998).

### 3.4.2.1 Induktion von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> durch Galaktose

Das Deg1:Sec62<sup>ProtA</sup>-Konstrukt ist auf einem Plasmid mit *URA3*-Markergenen codiert und unter der Kontrolle eines *Ga1*-10-Promotors geschaltet. Um die Minimalinduktionszeit zu ermitteln, wurde d/o Ura-Medium mit 2% Sucrose und 2% Galaktose mit Transformanten des *sec63-201*-Stammes und des dazugehörigen Wildtyps beimpft. Aus dieser Kultur wurde nach verschiedenen Zeitpunkten (2, 4, 6, 8 und 24 h) Proben entnommen, die Zellen aufgeschlossen (siehe Punkt 2.9.1), zum Western Blot eingesetzt und mittels Immunfärbung gegen Sec62p analysiert. Das genomisch-codierte wtSec62p wurde zur Ladekontrolle verwendet. Eine zusätzlich Probe in d/o Ura-Medium mit 2% Glukose wurde zur Kontrolle inkubiert und mitgeführt, da durch Glukose der Galaktose-Promotor inhibiert wird.

Wie in Abb. 3.25 zu sehen ist, ist das Protein erstmals nach 4 h detektierbar. Aber erst nach 8 h scheint Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> voll exprimiert zu sein (siehe Abb. 3.25). Das man nach 24 h kaum Substrat sehen kann, lässt sich wahrscheinlich eher auf die bis dahin hohe OD<sub>600</sub>

und damit höherem Anteil an toten Zellen zurückführen. In den nachfolgenden Experimenten wurde eine Induktionszeit von 15 h gewählt.

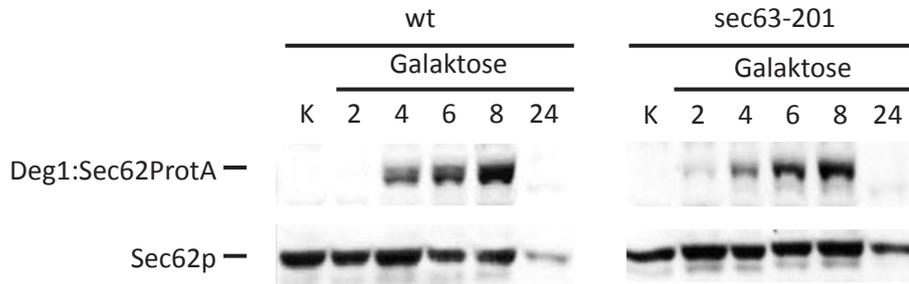


Abbildung 3.25: Test der Galaktose-Induktionszeit von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup>

Transformanten der Mutante *sec63-201* und der passende Wildtyp DNY54 wurden über Nacht in d/o Ura-Medium mit 2% Raffinose inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Kultur in d/o Ura-Medium mit 2% Glukose mitgeführt. Aus der Raffinose-Kultur wurde anschließend je eine Flüssigkultur d/o Ura-Medium mit 2% Sucrose und 2% Galaktose zu einer  $OD_{600}=0,2$  angeimpft. Davon wurden nach angegebenen Stunden eine Probe von  $OD_{600}=1$  entnommen und mittels Glasperlen aufgeschlossen. Je  $OD_{600}=0,125$  wurden auf ein 12,5%iges Gel aufgetragen, mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Antikörpern gegen Sec62p detektiert.

### 3.4.2.2 ERAD von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> in *sec63-201*

Der ERAD von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> wurde nun in der Deletionsmutante *sec63-201* in einem Cycloheximid-Chase untersucht (siehe Punkt 2.9.11). Als Ladekontrolle wurde auch hier das genomisch codierte Sec62p mitgefärbt. Jedoch ist, wie in Abb. 3.26 dargestellt, hier nur ein kleiner Unterschied im Vergleich zu dem Wildtyp zu sehen. Die  $t_{1/2}$  liegt laut Literaturwert bei ungefähr 13 min (Scott & Schekman, 2008). Dies stimmt mit den in Abb. 3.26 dargestellten Ergebnissen überein. Ein Importdefekt von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> kann hier nicht festgestellt werden, weil mit dieser Methode ein „steady-state“-Level des Proteins gezeigt wird und kein neusynthetisiertes Protein. Somit wäre wahrscheinlich selbst bei einem Importdefekt Zeit, das Protein zu importieren. Ein Importdefekt dieses Substrats in *sec63-201* ist aber unwahrscheinlich, da Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> cotranslational importiert wird und fast nur der posttranslationale Import in *sec63-201* gestört ist (Ng et al., 1996; Rubenstein et al., 2012). Der minimale Degradationsunterschied der beiden Stämme lässt keine Aussage für einen klaren Effekt zu (siehe Abb. 3.26). Der C-terminale Bereich von Sec63p, der in *sec63-201* deletiert ist, scheint also keine nachweisbare Auswirkung auf den ERAD dieses Transmembranproteins zu haben.

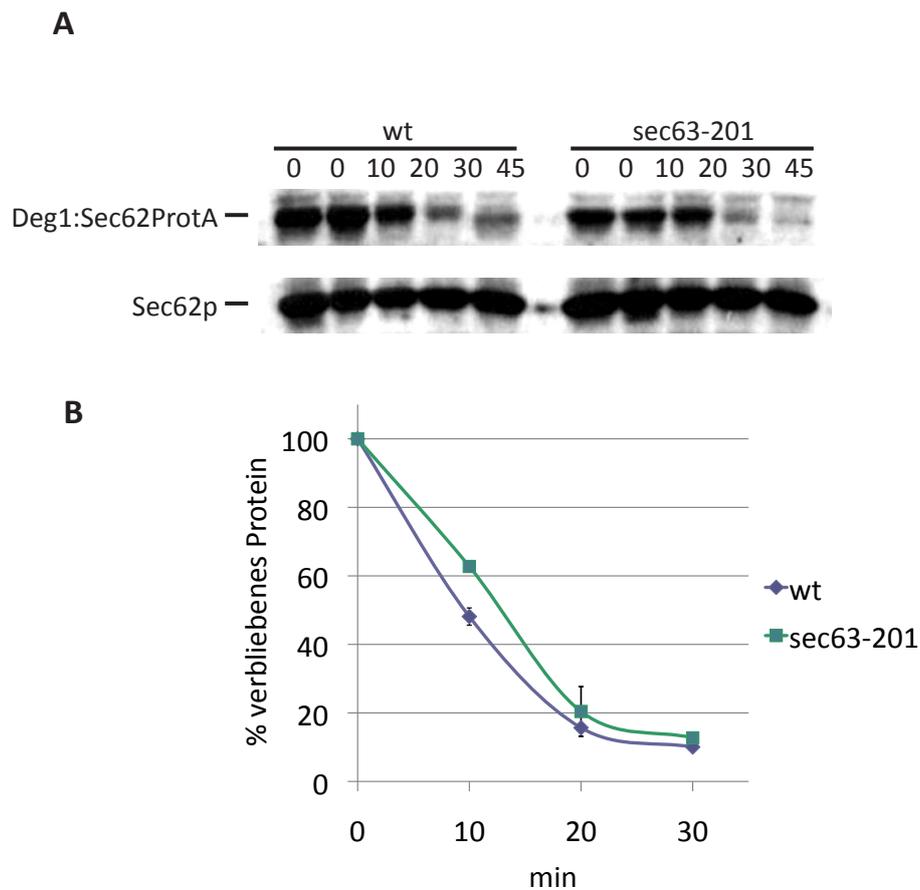


Abbildung 3.26: ERAD von Deg1:Sec62<sup>ProtA</sup> in *sec63-201*

**A:** Die Mutante *sec63-201* und der passende Wildtypstamm (DNY54) wurden mit Cycloheximid-Chase auf Deg1:Sec62<sup>ProtA</sup>-Degradation getestet. Die Stämme wurden in Selektionsmedium mit 2% Raffinose inkubiert und zur Induktion von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> in Selektionsmedium mit 2% Galaktose und 2% Sucrose über Nacht inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub>=1 wurde 200 µg/ml Endkonzentration Cycloheximid zugegeben. Je OD<sub>600</sub>=2 wurden pro Zeitpunkt entnommen und aufgeschlossen. Auf einem 12,5%igen Gel wurden OD<sub>600</sub>=0,4 der Extrakte aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem Antikörper gegen Sec62p detektiert. Als Ladekontrolle ist zusätzlich Sec62p mit aufgezeigt. **B:** Graphische Darstellung der Degradation. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichung ist ebenfalls angezeigt.

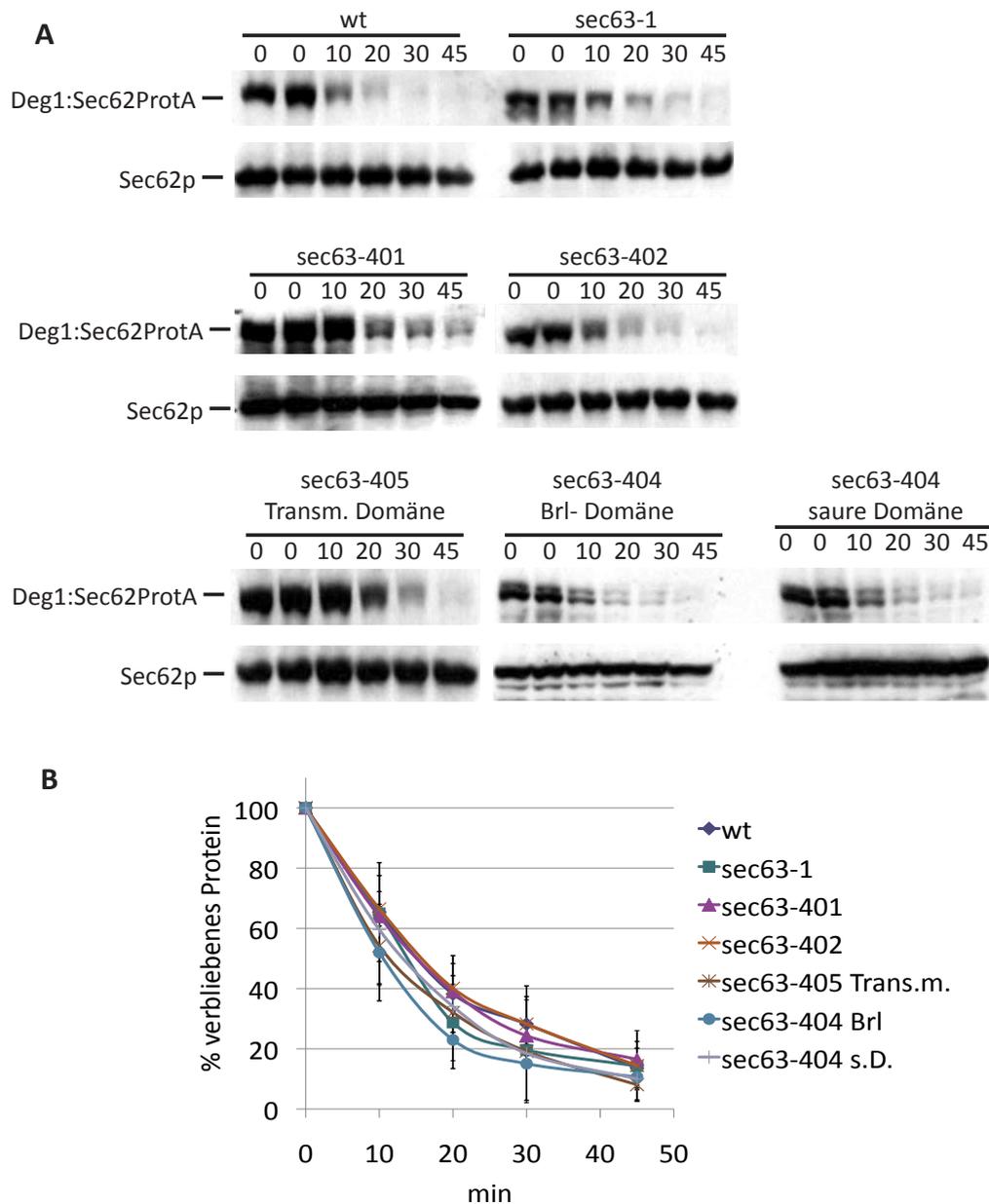


Abbildung 3.27: ERAD von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> in sec63-Mutanten

**A:** Der wildtypische W303-1C, sowie verschiedene sec63-Mutanten wurden mit Cycloheximid-Chase auf Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup>-Degradation getestet. Die Stämme wurden in Selektionsmedium mit 2% Raffinose inkubiert und zur Induktion von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> in Selektionsmedium mit 2% Galaktose und 2% Sucrose über Nacht inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub>=1 wurde 200 µg/ml Endkonzentration Cycloheximid zugegeben. Je OD<sub>600</sub>=2 wurden pro Zeitpunkt entnommen und aufgeschlossen. Auf einem 12,5%igen Gel wurden OD<sub>600</sub>=0,4 der Extrakte aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem Antikörper gegen Sec62p detektiert. Als Ladekontrolle ist zusätzlich Sec62p mit aufgezeigt. **B:** Graphische Darstellung der Degradation. Es wurden Mittelwerte aus 4 Experimenten verwendet. Die Standardabweichung ist ebenfalls angezeigt.

### 3.4.2.3 ERAD von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> in den neuen sec63-Mutanten

Der ERAD der *sec63*-Mutanten wurde ebenfalls mit dem ERAD-Substrat Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> getestet. Dabei wurde wie bereits beschrieben vorgegangen (siehe Punkt 3.4.2.2). Es wurde auch hier eine Vorkultur mit Raffinose verwendet und die Galaktose-Induktion erfolgte über Nacht. Getestet wurden die beiden DnaJ-Domänen-Mutanten *sec63-401* und *sec63-402*, sowie, zur Kontrolle der anderen Proteinbereiche, die Stämme *sec63-405* Transmembrandomäne, *sec63-404* Brl und *sec63-404* saure Domäne. Wie in Abb. 3.27 zu erkennen ist, unterscheiden sich die getesteten Stämme nicht wesentlich in ihrer  $t_{1/2}$  von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup>. Alle getesteten Mutanten liegen etwa in dem  $t_{1/2}$ -Bereich des Wildtyps, aber streuen leicht (ungefähr 13 min; Scott & Schekman, 2008). Es scheint aber, dass Sec63p nicht bei dem ERAD dieses transmembranen ERAD-Substrates notwendig ist.

### 3.4.2.4 ERAD von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> bei Sec63p-Überexpression

Mades et al., 2012 hatten gezeigt, dass in Säugern die Expressionsrate von Sec63p mit dem „steady-state“-Level von polytopischen Proteinen korreliert. Deshalb habe ich zum Test eines Einflusses des Sec63p-Gehaltes auf die Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> Degradation einen Cycloheximid-Chase mit überexprimiertem Sec63p durchgeführt. Dafür wurde das gleiche Plasmid-Konstrukt, wie unter Punkt 3.4.1.6 beschrieben, verwendet. Da ohne Galaktose-Induktion kein ERAD-Substrat exprimiert worden wäre, war es nicht möglich, eine Kontrolle unter Glukose-Stimulation mitzuführen. Deshalb wird in Abb. 3.28 B zum Vergleich zusätzlich die Degradationskurve des Wildtyps aus Punkt 3.4.2.3 eingezeichnet. Es konnte keinen Einfluss des erhöhten Sec63p-Gehalt auf die Degradationsgeschwindigkeit von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.28).

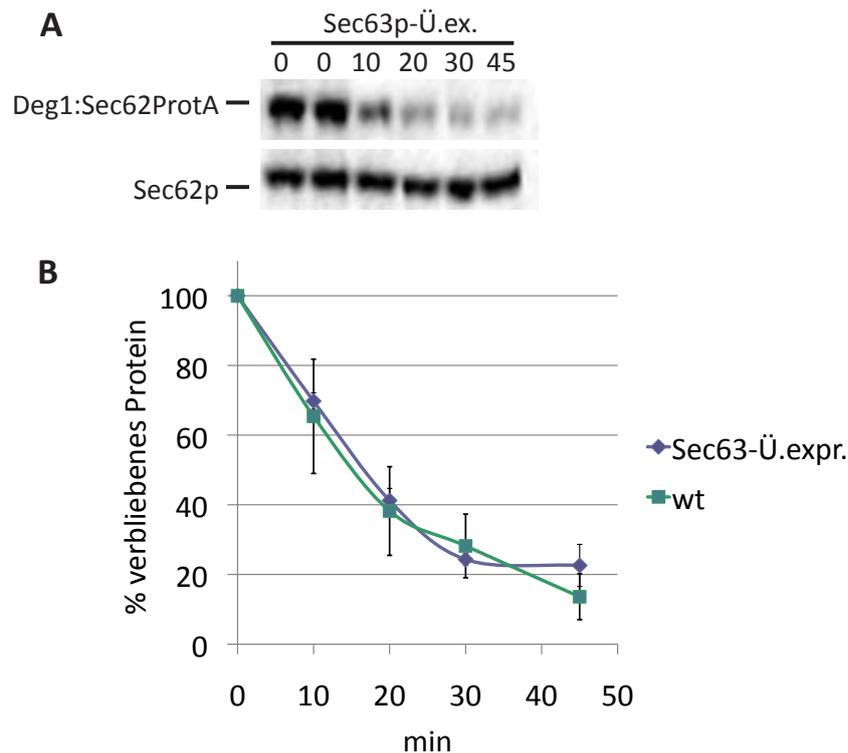


Abbildung 3.28: ERAD von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> bei überexprimiertem Sec63p

**A:** Der *wtSEC63-LEU2*-Stamm wurde mit dem *Gal-SEC63-pRS314* und *DEG1:SEC62ProtA-URA3*-Plasmid transformiert und zum Cycloheximid-Chase eingesetzt. Von einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur mit d/o Trp Ura-Medium mit 2% Raffinose beimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Kultur wurde in d/o Trp Ura mit 2% Galaktose und 2% Sucrose überimpft zur Induktion des Gal-Promotors. Bei einer OD<sub>600</sub>=1 wurde 200 µg/ml Endkonzentration Cycloheximid zugegeben. Je OD<sub>600</sub>=2 wurden pro Zeitpunkt entnommen und aufgeschlossen. Auf einem 12,5%igem Gel wurden OD<sub>600</sub>=0,4 der Extrakte aufgetrennt, mit Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit einem Antikörper gegen Sec62p detektiert. Als Ladekontrolle ist zusätzlich Sec62p mit aufgezeigt. **B:** Graphische Darstellung der Degradation. Zum Vergleich ist noch die in Abb. 33 gezeigte *wt*-Kurve mit aufgezeigt. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichung ist ebenfalls angezeigt.

### 3.4.3 Degradation des löslichen ERAD-Substrats KHN

Unterschiede bei der Degradation von löslichen und Transmembranproteinen wurden weitergehend anhand der Substrate KHN und KWW untersucht (siehe Abb. 3.15). Diese Substrate wurden von Davis Ng zur Verfügung gestellt und in den Publikationen von Shilpa Vashist ausführlich getestet (Vashist & Ng, 2004; Vashist et al., 2001). Bei KHN handelt es sich um eine Form der Affen-Virus 5 Hämagglutinin Neuraminidase (HN), bei dem die Signal-Anker

Domäne durch die Signalsequenz von Kar2p ausgetauscht wurde (Vashist et al., 2001). Diese Signalsequenz ist abspaltbar und verleiht dem Protein die Fähigkeit zum co- und posttranslationalen Import (Vashist et al., 2001).

Außerdem wurde noch das Protein KWW getestet. Dabei handelt es sich um ein ERAD-Substrat bei dem die luminaire Domäne von Wsc1p durch KHN ausgetauscht wurde (siehe Abb. 3.15). Wsc1p ist ein nicht essentielles Signalprotein in der Plasmamembran und besitzt eine Transmembrandomäne (Vashist et al., 2001). KHN und KWW werden im Golgi-Apparat an O-Glykosylierungsstellen weiter modifiziert, wodurch bei den späteren Zeitpunkten nicht-diskrete Banden zu sehen sind, die im Proteingel langsamer wandern (Vashist et al., 2001).

#### **3.4.3.1 ERAD von KHN und KWW in *sec63-201***

Beide Substrate haben im Wildtyp eine  $t_{1/2}$  von etwa 30 min, was ungefähr mit dem Literaturwert von 35 min übereinstimmt (Vashist et al., 2001). Die Mutante *sec63-201* zeigt einen partiellen Import-Defekt für Kar2p, dessen Signalsequenz für diese ERAD-Substrate verwendet wurde, wenn auch nicht vollständig, wie bei CPY\*-Import (siehe Abb. 3.17; Ng et al., 1996). Durch den besseren Import von KHN und KWW konnte in der Mutante *sec63-201* ein deutlicher Unterschied des ERAD beider Substrate nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.29). KHN wird mit einer  $t_{1/2}$  von ungefähr 45 min deutlich langsamer degradiert als KWW, was die gleiche  $t_{1/2}$  wie im Wildtyp zeigte (siehe Abb. 3.29). Also wird in dieser *sec63*-Mutante nur das lösliche Substrat langsamer abgebaut und nicht das Transmembranprotein KWW.

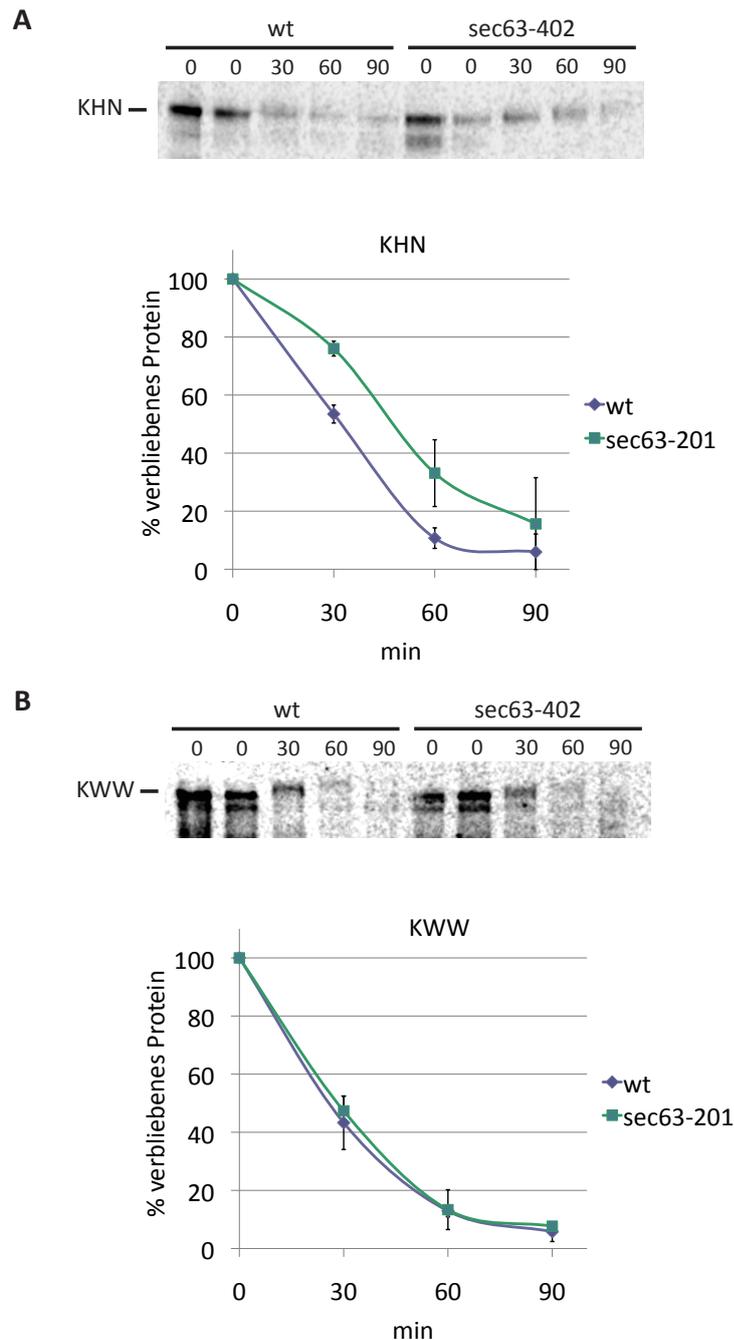


Abbildung 3.29: ERAD von KHN und KWW in *sec63-201*

**A:** Die Mutante *sec63-201* und der dazugehörige Wildtyp DNY54 wurden im Pulse-Chase auf KHN-ERAD getestet. Die Stämme wurden bei 30 °C über Nacht bis zur frühen logarithmischen Phase angezogen, auf  $OD_{600}=1$  in 250  $\mu$ l Label-Medium eingestellt und anschließend für 20 min gehungert und 5 min mit  $^{35}$ S-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt, der gefällte Überstand mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. Die Graphische Darstellung der Degradationskurven ist im unteren Bildbereich zu sehen. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben. KWW-ERAD ist in **B:** zu sehen.

### 3.4.3.2 ERAD von KHN in *sec63-402*

Das ERAD-Substrat KHN wurde auch in der DnaJ-Domänen-Mutante *sec63-402* im Pulse-Chase eingesetzt. Das Substrat KWW konnte in der Mutante nach radioaktiver Markierung und Analyse mittels Proteingel und Phosphorscreen leider nicht nachgewiesen werden.

Die  $t_{1/2}$  des Wildtyps KRY875 liegt mit ungefähr 35 min genau bei den Literaturwerten ähnlich wie der Wildtyp DNY54 (Vashist & Ng, 2004). Jedoch zeigt auch die Mutante *sec63-402* eine leichte, aber reproduzierbare Stabilisierung von KHN (siehe Abb. 3.30). Die  $t_{1/2}$  in *sec63-402* liegt bei etwa 45 min (siehe Abb. 3.30). Also ist auch hier unabhängig von dem Importweg eine Stabilisierung eines luminalen ERAD-Substrats zu erkennen.

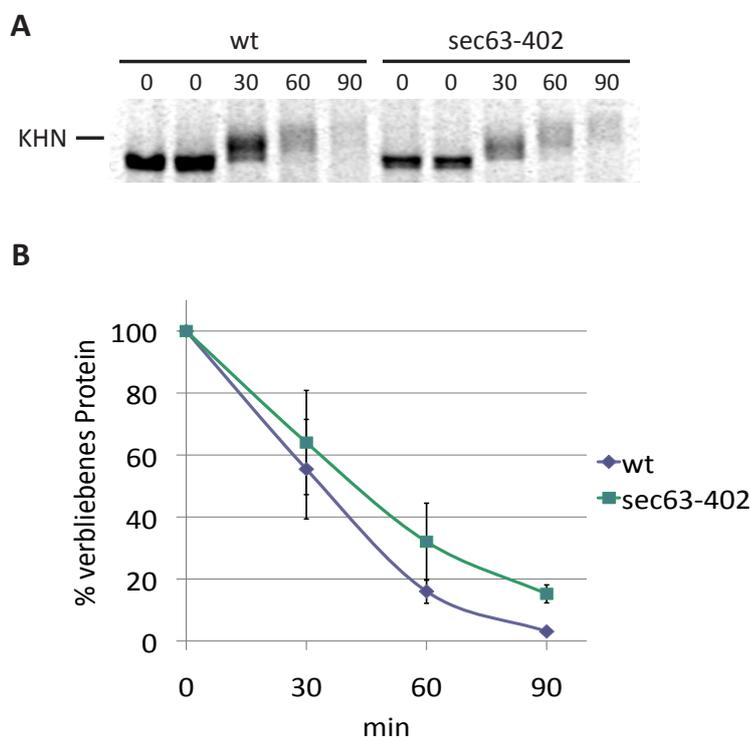


Abbildung 3.30: KHN-Degradation in *sec63-402*

**A:** Die Mutante *sec63-402* und der Wildtyp KRY875 wurden im Pulse-Chase auf KHN-ERAD getestet. Die Stämme wurden bei 30 °C über Nacht bis zur frühen logarithmischen Phase angezogen, auf  $OD_{600}=1$  in 250  $\mu$ l Label-Medium eingestellt und anschließend für 20 min gehungert und 5 min mit  $^{35}$ S-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt und der gefällte Überstand wurde mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.4.4 ERAD von Sec61-2p in *sec63*-Mutanten

Als Beispiel für ein polytopes ERAD-Substrat wurde Sec61-2p ausgewählt, das einen Aminosäureaustausch in der AS 213 von Glycin zu Aspartat am Anfang der 5. Transmembrandomäne trägt (Sommer & Jentsch, 1993). Dieses Protein wird cotranslational importiert.

In Abb. 3.31 sind die Pulse-Chase-Experimente in den Mutanten *sec63-402*, sowie Kontrollen zu Mutationen in der ersten Transmembrandomäne, Brl und sauren Domäne dargestellt. Das Substrat zeigt im Wildtyp eine  $t_{1/2}$  von etwa 24 min. Dies liegt deutlich über dem Literaturwert von etwa 12 min (Vashist & Ng, 2004). Möglicherweise ist dafür der Stammhintergrund verantwortlich.

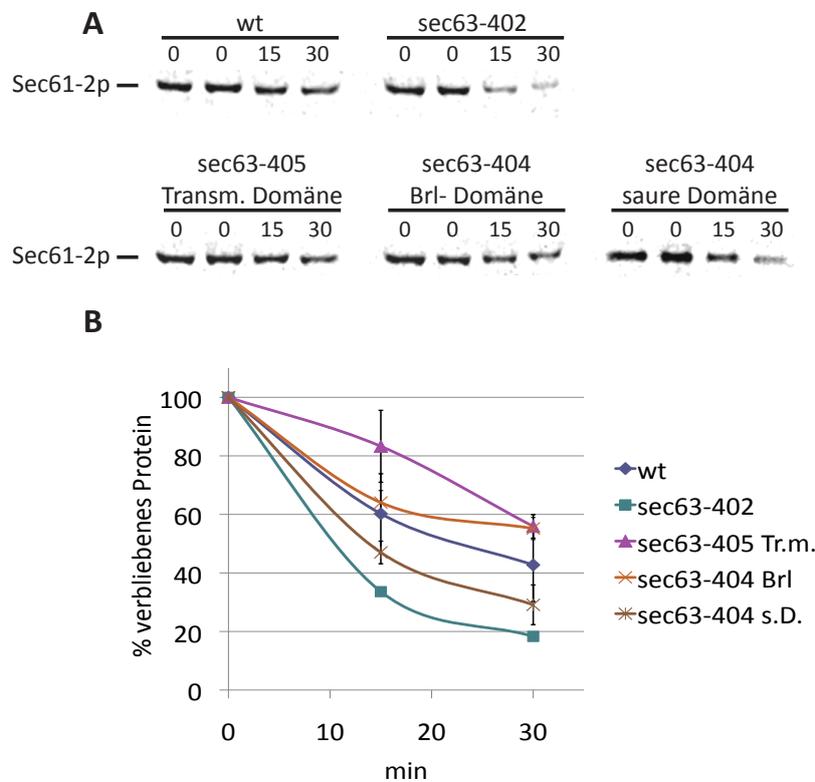


Abbildung 3.31: ERAD von Sec61-2p in *sec63*-Mutanten

**A:** Die Stämme KRY875, *sec63-402*, *sec63-405* Transmembrandomäne, *sec63-404* Brl-Domäne und *sec63-404* saure Domäne wurden im Pulse-Chase auf Sec61-2p-ERAD getestet. Die Zellen wurden auf  $OD_{600}=1$  in 250  $\mu$ l eingestellt. Die Kulturen wurden 20 min lang gehungert und 5 min mit  $^{35}$ S-Met/Cys gelabelt. Der Chase wurde nach den angegebenen Zeiten mit Tris-Azid gestoppt und der gefällte Überstand wurde mit einem 10%igen Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. Als wt wurde KRY875 verwendet. **B:** Graphische Darstellung der Degradationskurven. Es wurden Mittelwerte aus 3 Experimenten verwendet. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Degradationszeit von Sec61-2p in der *sec63-404* Brl-Mutante ist vergleichbar mit der des Wildtyps (siehe Abb. 3.31). Die beiden Mutanten *sec63-402* und *sec63-404* saure Domäne sind jedoch wesentlich schneller mit  $t_{1/2}$  von jeweils 12 bzw. 14 min (siehe Abb. 3.31). Nur *sec63-405* Transmembrandomäne zeigt eine deutliche Stabilisierung dieses Substrats mit einer  $t_{1/2}$  von etwa 35 min (siehe Abb. 3.31). Wahrscheinlich spielen bei der Degradation noch andere Faktoren mit eine Rolle, wie die Interaktion von Sec63p mit dem Sec61-Komplex, und auch der UPR-Status der Mutanten könnte ausschlaggebend für die Degradationsgeschwindigkeit von Sec61-2p sein.

## 4 Diskussion

Sekretorische Proteine verrichten im Organismus eine Reihe von essentiellen Aufgaben. In prokaryontischen Systemen werden sie zu ihren Wirkungsorten transportiert und dabei aus der Zelle heraus geschleust oder in die Zellwand eingebaut. In Eukaryonten jedoch haben sich innerhalb der Zelle verschiedene Kompartimente gebildet, die durch Membranen von dem Cytosol abgetrennt sind (Palade, 1975). Proteine, die zu diesen Kompartimenten innerhalb der Zelle transportiert werden, durchlaufen meist ebenfalls den sekretorischen Weg (Delic et al., 2013). Die erste Station stellt dabei das ER dar, wo die sekretorischen und transmembranen Proteine O- und N-glykosyliert werden können, Proteindisulfidbrücken ausgebildet werden und ihre korrekte Faltung überwacht wird (Hou et al., 2012). Bei dieser Prozessierung ist es von wesentlicher Bedeutung, dass sekretorische und transmembrane Proteine unter genauer Qualitätskontrolle stehen und streng auf korrekte Faltung und Struktur geprüft werden. Bestehen die Proteine die Kontrolle nicht, werden sie dem ERAD-Weg zugeführt, aus dem ER exportiert und von dem Proteasom degradiert (Römisch, 2005).

Der Mechanismus des Exports fehlgefalteter Proteine aus dem ER-Lumen ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Daten deuten darauf hin, dass Sec63p daran beteiligt sein könnte. Unter Anderem konnte in Ng et al., 2007, Sec63p als einziges Protein des Sec63-Komplexes mit ER-assoziierten Proteasomen copräzipitiert werden, Sec63p trug jedoch nicht zur Bindung des Sec61-Komplexes an das Proteasom bei. Auch das ER-luminale Chaperon Kar2p wurde mit Proteasomen-assoziierten Sec61-Komplexen mitgefällt, wahrscheinlich über die Interaktion mit der DnaJ-Domäne des Sec63p (Ng et al., 2007). Allerdings wurde vor meiner Arbeit nur eine *sec63*-Mutante hinsichtlich ihres Effekts auf ERAD untersucht (Plemper et al., 1997; Pilon et al., 1997). Diese Mutante, die eine Punktmutation in der DnaJ-Domäne (*sec63-1*) trägt, ist jedoch „leaky“ und deshalb ist es nicht klar, ob die beobachteten ERAD-Defekte auf Sec63p oder auf eine defekte ER-Struktur in dieser Mutante zurückzuführen sind.

In meiner Arbeit habe ich die Rolle von Sec63p in ERAD weiter untersucht. Dafür habe ich weitere *sec63*-Mutanten generiert und mit Hilfe der Akkumulation des ERAD-Substrats CPY\* die Mutanten selektiert, die einen potentiellen ERAD-Defekt aufwiesen (siehe Abb.

3.6). So konnte ich sechs neue *sec63*-Mutanten isolieren, die eine bis fünf Punktmutationen verteilt über verschiedene Domänen des Gens trugen (siehe Abb. 3.5). Nur bei der DnaJ-Domänen Mutante *sec63-402* konnte ich eine deutliche Akkumulation von CPY\* mittels Colony Blot nachweisen und diese im Pulse-Chase bestätigen (siehe Abb. 3.6 und 3.16). Beim Testen weiterer ERAD-Substrate, fand ich, dass der ERAD-Defekt in *sec63-402* nur auf lösliche Proteine beschränkt war, denn beim ERAD von Transmembranproteinen konnte ich keine Beeinträchtigung beobachten (siehe Abb. 3.27 und 3.31).

## 4.1 Temperatur- und Stresssensitivität der neuen *sec63*-Mutanten

Die Mutationen in meinen neuen *sec63*-Mutanten waren in allen Domänen des Proteins lokalisiert (siehe Abb. 3.5). Als Erstes untersuchte ich das Wachstum der Mutanten auf festem Medium (siehe Abb. 3.7). Dabei konnte man klar erkennen, dass *sec63-201*, *sec63-404* und *sec63-406*, die Mutationen (*sec63-406* und *sec63-404*) bzw. eine Deletion (*sec63-201*) im C-terminalen Bereich haben, eine Temperatursensitivität bei 35 °C und 37 °C aufweisen (siehe Abb. 3.7). Die Mutanten *sec63-406* und *sec63-404* tragen Mutationen im C-terminalen Bereich der Brl- wie auch in der sauren Domäne (siehe Abb. 3.5). Beide Mutanten tragen eine Mutation in dem Interaktionsbereich mit Sec62p, wofür die letzten 14 Aminosäuren der sauren Domäne verantwortlich sind (Willer et al., 2003). Die Brl-Domäne hingegen wird zur Stabilisierung des Sec61-Komplexes benötigt, was möglicherweise durch direkte Bindung an Sec61p vermittelt wird (Jermy et al., 2006; Harada et al., 2011). Außer der Mutation im Sec62p-Interaktionsbereich trägt *sec63-404* noch weitere drei Mutationen im C-terminalen Bereich der Brl-Domäne (siehe Abb. 3.5). In *sec63-406* sind desweiteren noch zwei Mutationen in der Brl- und noch eine Mutation in der sauren Domäne vorhanden (siehe Abb. 3.5). Die Mutante *sec63-404* war bereits ab 35 °C nicht mehr lebensfähig, *sec63-406* hingegen schon (siehe Abb. 3.7). Jedoch zeigte *sec63-406* ein schwächeres Wachstum als der Wildtyp (siehe Abb. 3.7).

Um den Einfluss der einzelnen Domänen auf verschiedene Funktionen von Sec63p weiter einzugrenzen, habe ich die mutierten Domänen durch Klonierung vereinzelt und in das *wt-SEC63*-Gen eingefügt (mutierte Transmembrandomänen inklusive DnaJ-Domäne, Brl- oder saure Domäne). Nach Wachstumstest mit diesen neuen Stämmen war ersichtlich, dass die Temperatursensitivität bei *sec63-406* auf die Mutationen in der sauren Domäne zurückzuführen ist. Bei *sec63-404* scheinen aber die Mutationen sowohl in der Brl- als auch in der

sauren Domäne die Sensitivität für hohe Temperaturen zu beeinflussen (siehe Abb. 3.9 und 3.10). Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, wo Mutationen in dem jeweiligen Interaktionsbereich von Sec63p mit Sec62p oder dem Sec61-Komplex die Interaktion instabil werden lässt, was bei höheren Temperaturen noch verschlechtert werden kann (Jermy et al., 2006; Deshaies & Schekman, 1990).

Tunicamycin führt zur Hemmung der N-Glykosylierung, was eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen nach sich zieht und somit ein Überladen des ER mit putativen ERAD-Substraten. Eine Sensitivität für diesen ausgelösten Zellstress steht oft im Zusammenhang mit Defekten im ERAD (Travers et al., 2000; Lipson et al., 2008; Tran et al., 2011). Eine Sensitivität für Tunicamycin wurde bei 30 °C nur bei *sec63-402* beobachtet, wobei bei den temperatursensitiven Stämmen Zugabe von Tunicamycin bei hohen Temperaturen das Wachstum ebenfalls behinderte (siehe Abb. 3.7).

## 4.2 Charakterisierung des co- und posttranslationalen Protein-Imports ins ER in den *sec63*-Mutanten

Sec63p ist sowohl im posttranslationalen als auch beim cotranslationalen Import involviert (Sec61-Komplex: Brodsky et al., 1995; Ssh1-Komplex: Spiller & Stirling, 2011). Dies konnte vor Kurzem auch in Mammalia für bestimmte, meist kleine Substrate bestätigt werden (Johnson et al., 2013). Für beide Protein-Importwege ist in Hefe die Interaktion von Sec63p mit dem Sec61-Komplex wichtig ((Jermy et al., 2006)). Die Interaktion von Sec63p mit Sec62p ist hingegen von wesentlicher Bedeutung für den posttranslationalen Import und das Wachstum der Hefen (Rothblatt et al., 1989; Deshaies & Schekman, 1990).

Diesen Einfluss der Sec63p-Interaktion mit Sec61p/Sec62p auf den Protein-Import stimmt auch weitgehend mit den Beobachtungen in *sec63-404* und *sec63-406* überein (siehe Abb. 3.11). Nach Untersuchung der Mutanten mit vereinzelt mutierten Domänen konnte, ähnlich wie bei der Temperatursensitivität, festgestellt werden, dass bei *sec63-404* die Mutationen in Brl- und saurer Domäne zu den co- und posttranslationalen Importdefekten beitragen (siehe Abb. 3.12). Bei *sec63-406* schienen aber hauptsächlich die Mutationen in der sauren Domäne für den Importdefekt verantwortlich zu sein (siehe Abb. 3.12). Es war überraschend, dass die Mutationen in der sauren Domäne ebenfalls Auswirkungen auf den cotranslationalen Importweg hatten, da die Interaktion mit Sec62p hauptsächlich wichtig für den posttranslationalen Import ist und eine Deletion der sauren Domäne von Sec63p kaum Effekt auf den cotranslationalen Import aufweist (Willer et al., 2003; Jermy et al., 2006). Jedoch konnten Reithinger

und Kollegen vor Kurzem nachweisen, dass Sec62p bei der cotranslationalen Insertion und der Orientierung von moderat-hydrophoben Signal-Anker-Proteinen eine Rolle spielt (Reithinger et al., 2013). Allerdings ist Sec62p bei der Insertion des wildtypischen Pho8p nicht beteiligt (Reithinger et al., 2013). Möglicherweise liegt der Fall bei dem von mir verwendeten Reporterprotein Pho8-Ura3p anders, was den verschlechterten cotranslationalen Import dieses Proteins erklären würde (siehe Abb. 3.12). Die mutierte Brl-Domäne hatte einen stärkeren Effekt auf den posttranslationalen Import als auf den cotranslationalen (siehe Abb. 3.12). Womöglich ist diese Domäne wichtiger für die Stabilisierung des heptameren SEC Komplexes als für die Stabilität des Ribosom-gebundenen cotranslationalen Komplexes.

Die Sec63p-DnaJ-Domäne ist hingegen nur für den posttranslationalen Import wichtig (Brodsky & Schekman, 1993; Lyman & Schekman, 1995). Dies zeigte sich auch in der *sec63-402*-Mutante, die ausschließlich einen leichten posttranslationalen Importdefekt aufwies (siehe Abb. 3.11). Ebenfalls einen posttranslationalen Importdefekt zeigte *sec63-405*, die eine Punktmutation in der ersten Transmembrandomäne und im N-terminalen Bereich der Brl-Domäne trägt (siehe Abb. 3.5). Nach Untersuchung der Effekte der vereinzelt mutierten Domänen wurde klar, dass die Mutation in der Transmembrandomäne den posttranslationalen Importdefekt in *sec63-405* verursacht (siehe Abb. 3.12). Wahrscheinlich kommt es in diesem mutierten Sec63p zu einer Störung der Konformation, wodurch auch die Bildung des heptameren Komplexes gestört werden könnte.

Die beobachteten Importdefekte in meinen neuen *sec63*-Mutanten konnte ich auch in den Pulse-Chase-Experimenten bestätigen (siehe Abb. 3.16). Jedoch war die Stärke der beobachteten Import-Defekte in beiden Assays etwas unterschiedlich, insbesondere wenn man die Stämme *sec63-403*, *sec63-404* und *sec63-405* vergleicht (siehe Abb. 3.11 und 3.16). Diese Unterschiede sind vermutlich auf die Kinetik des Imports zurückzuführen, da bei einem Pulse-Chase nur die neu-synthetisierten Proteine, die innerhalb der 2 min Labeling-Zeit translatiert werden, untersucht werden. In dem *in vivo* Protein-Import-Assay hingegen wurde ein „steady state“-Level dargestellt von cytosolisch akkumulierten Vorläufer-Protein aufgrund des Proteinimportdefekts.

### 4.3 Erhöhte UPR-Aktivität in *sec63-402*

Defekte im ERAD lösen meist Aktivierung der UPR aus (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000). Deshalb habe ich in dieser Arbeit ebenfalls den UPR-Status von einigen der neuen *sec63*-Mutanten mit Hilfe zweier verschiedener Assays untersucht. Einmal habe ich die *sec63*-Stämme mit einem  $\Delta ire1$ -Stamm gekreuzt, bei dem ERAD-defekte haploide Nach-

kommen synthetisch letal wären (siehe Chen et al., 2005). Außerdem habe ich einen Reporter-Assay verwendet, bei dem die Aktivierung des UPRE die Expression eines Reporterproteins verursacht, welches in einer anschließenden Reaktion ein chromogenes Substrat umwandelt, das photometrisch gemessen werden kann (siehe Cox et al., 1993).

Leider hat die Kreuzung mit dem  $\Delta ire1$ -Stamm nicht gut funktioniert (siehe Abb. 3.13). Nach Umsetzung auf Sporulationsmedium sind nur sehr wenige haploide Stämme angewachsen. Es war auch nicht möglich, einen lebensfähigen *SEC63 $\Delta$ ire1* zu generieren. Bei vielen Stämmen konnte ich zwar noch wenige Teilungszyklen feststellen bevor sie das Wachstum eingestellt haben, jedoch waren nie genug Sporen einer Tetrade angewachsen um daraus auf den Genotyp der nicht-gewachsenen Sporen zu schließen (siehe Abb. 3.13). Die Ursache für das schlechte Wachstum ist schwierig zu erklären, da viele mögliche Genotypen keine lebensfähigen Stämme erzeugt hätten.

Die UPR-Aktivität konnte ich erfolgreich mit dem UPRE-lacZ-Reportersystem untersuchen (siehe Abb. 3.14). Dabei untersuchte ich *sec63-402*, der eine Akkumulation von CPY\* gezeigt hatte (siehe Abb. 3.6), sowie *sec63-404*, der Stamm, der den stärksten post- und cotranslationalen Importdefekt aufwies (siehe Abb. 3.11). Die Mutante *sec63-402* zeigte eine sehr starke UPR-Aktivität, die im Vergleich mit dem Wildtyp etwa vier Mal so hoch war (siehe Abb. 3.14). Dies war im Bereich der vollen UPR-Induktion, wie sie durch Tunicamycin-Behandlung (etwa 4,5fach höher als unbehandelter wt) ausgelöst wurde (nicht gezeigt). Der Stamm *sec63-404* zeigte ebenfalls eine UPR-Induktion, jedoch nur etwa doppelt so hoch wie der Wildtyp. Eine erhöhte UPR-Antwort deutet auf eine gestörte Proteinhomöostase in diesen Stämmen hin (Gardner et al., 2013). Kabani und Kollegen haben in ERAD-defekten *kar2*-Mutanten (*Kar2-1p* und *Kar2-133p*), die eine verminderte Affinität für ERAD-Substrate aufwiesen, ebenfalls eine stark erhöhte UPR festgestellt (Kabani et al., 2003). Diese Mutanten waren jedoch weiter kompetent für Protein-Import (Kabani et al., 2003). Die Autoren haben das auf die Kompensation der verminderten Peptidaffinität durch eine Erhöhung der Expression der *kar2*-Mutanten zurückgeführt (Kabani et al., 2003). Da in *sec63-402* die UPR ebenfalls stark erhöht ist, könnte man daraus folgern, dass auch in diesem Fall die Zelle eine mögliche Minderung der Interaktion von Sec63-402p und Kar2p durch eine Überexpression von Kar2p zu kompensieren versucht. In der Publikation von Vembar et al., 2010 wird aber eine *kar2*-Mutante vorgestellt, die eine schwächere Sec63p-Interaktion aufweist, aber keine erhöhte UPR-Induktion (Vembar et al., 2010). Diese Mutante (R217A) hat jedoch auch keinen ERAD-Defekt (Vembar et al., 2010). Zwei andere *kar2*-Mutanten (*K584X* und *S493F*), zeigen einen ERAD-Defekt, erhöhte UPR-Aktivität und eine Verminderung der Substratbindung, aber keine Beeinträchtigung der Interaktion mit Sec63p (Vembar et al., 2010). Also

steht die erhöhte UPR-Aktivität wahrscheinlich nur im Zusammenhang mit einem ERAD-Defekt und nicht mit der Interaktion von Kar2p und Sec63p.

## 4.4 ERAD löslicher und transmembraner Substrate in *sec63*-Mutanten

Ich untersuchte anschließend, ob alle oder nur spezifische ERAD-Substrate Sec63p-abhängig abgebaut werden. Dafür verglich ich ERAD von löslichen Substraten, wie CPY\* und KHN, mit ERAD von Substraten mit einer verschiedenen Anzahl von Transmembrandomänen, wie KWW, Deg1::Sec62p<sup>ProtA</sup> und Sec61-2p (siehe Abb. 3.15). Dabei konnte ich eindeutig zeigen, dass nur die löslichen Substrate CPY\* und KHN eine längere  $t_{1/2}$  aufwiesen in *sec63-402* als im Wildtyp (siehe Abb. 3.16 und 3.30). Bei den Transmembran-Proteinen konnte ich keine Veränderung der Degradationsrate beobachten (siehe Abb. 3.27 und 3.31). Auch bei der Interaktion von Kar2p mit Jem1p und Scj1p konnte beobachtet werden, dass sie eine Rolle beim ERAD von löslichen ERAD-Substraten spielt, aber bei transmembranen ERAD-Substraten konnte kein Effekt festgestellt werden (Nishikawa et al., 2001). Diese DnaJ-Proteine sind nur bei der Degradation der löslichen Substrate CPY\* und  $\Delta\alpha F$  involviert, nicht aber beim Abbau des polytopen Sec61-2p (Nishikawa et al., 2001). Nach Einbeziehung der Daten dieser Arbeit scheint es, dass neben der Interaktion von Kar2p mit den J-Proteinen Jem1p und Scj1p auch die Interaktion von Kar2p mit Sec63p bei der Degradation von löslichen Proteinen eine Rolle spielt. Die hier gewählten ERAD-Substrate werden über den Hrd1-Komplex degradiert (Vashist et al., 2001; Vashist & Ng, 2004; Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup>: Rubenstein et al., 2012). Leider konnte ich das von mir gewählte ERAD-C-Substrat Ste6-166 in meinen Mutanten nicht exprimieren, weshalb Degradationsanalysen nicht möglich waren (Loayza et al., 1998; Vashist & Ng, 2004). Zukünftig wäre es jedoch empfehlenswert, ERAD-C-Substrate in *sec63-402* zu testen.

Bei der Degradation von CPY\* konnte eine Erhöhung der  $t_{1/2}$  von 20 auf 30 min beobachtet werden, jedoch nur in der DnaJ-Domänen Mutante *sec63-402* (siehe Abb. 3.16). Alle anderen *sec63*-Mutanten zeigten keinen Degradationsdefekt, obwohl einige einen wesentlich schwerwiegenderen Importdefekt als *sec63-402* aufwiesen (*sec63-404*, *sec63-405*; siehe Abb. 3.16). Der ERAD von CPY\* wurde auch in der bereits publizierten Mutante *sec63-201* getestet, bei der die letzten 27 Aminosäuren deletiert wurden (siehe Abb. 3.17; Ng et al., 1996). Allerdings liegt bei dieser Mutante ein starker Importdefekt vor, wodurch eine Auswertung des Effekts der Mutation auf ERAD nicht möglich war, da während der Labeling-Zeit nur

ein Bruchteil des radioaktiv markierten CPY\* in das ER-Lumen gelangen konnte (siehe Abb. 3.17).

Ich habe die Degradation von CPY\* in *sec63-402*-Zellen auch bei niedrigen und hohen Temperaturen getestet, da diese Mutante eine leichte Kälte- und Hitzesensitivität bei den Wachstumsexperimenten zeigte (siehe Abb. 3.7). Die  $t_{1/2}$  von CPY\* war in *sec63-402* bei 23 °C verdoppelt im Vergleich zu dem Wildtyp (siehe Abb. 3.20). Nishikawa und Kollegen untersuchten CPY\*-ERAD in der *sec63-1*-Mutante bei 23 °C und 37 °C und in  $\Delta scj1 \Delta jem1$ -Zellen (Nishikawa et al., 2001). In *sec63-1* konnte aber nur eine unwesentliche Veränderung der Degradationszeit beobachtet werden (Nishikawa et al., 2001). In den Stämmen, in denen allerdings die Gene für die beiden DnaJ-Proteine Jem1p und Scj1p deletiert waren, konnte eine Erhöhung der  $t_{1/2}$  von CPY\* bei 23 °C auf das 2,6fache des Wildtyps gezeigt werden (Nishikawa et al., 2001). Bei 37 °C wurden in dem  $\Delta scj1 \Delta jem1$ -Stamm nur 10% von CPY\* über die Chase-Zeit von 120 min degradiert (Nishikawa et al., 2001). Bei Vergleich der Resultate kann festgehalten werden, dass wohl alle drei im ER mit Kar2p interagierenden DnaJ-Proteine eine Rolle bei der Degradation von CPY\* spielen. Während Scj1p und Jem1p zusammen mit Kar2p die ERAD-Substrate löslich und somit Export-kompetent halten, verankert Sec63p Kar2p wahrscheinlich am Translokation, und damit an der Stelle, wo es beim Transport des ERAD-Substrats aus dem ER mitwirken kann.

Zur Untersuchung der Degradation von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> in den Mutanten verwendete ich einen Cycloheximid-Chase-Assay (siehe Abb. 3.27). Als Teststämme benutzte ich die drei DnaJ-Domänen Mutanten *sec63-1*, *sec63-401* und *sec63-402*, sowie je ein Beispiel für Mutationen in den anderen Domänen von Sec63p (*sec63-405* Transmembrandomäne, *sec63-404* Brl und *sec63-404* saure Domäne; siehe Abb. 3.27). Mit der Methode des Cycloheximid-Chase betrachtet man nicht die neu-synthetisierten Proteine, sondern einen „steady state“ des Proteinlevels in der Zelle. Bei Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> handelt es sich um ein synthetisches Konstrukt, dass über den Hrd1-Komplex degradiert wird, obwohl die Deg1-Sequenz ein Substrat üblicherweise dem Doa10-Weg zuführt (Swanson et al., 2001; Hochstrasser & Varshavsky, 1990). Bei der Degradation gelangt dabei der cytoplasmatisch lokalisierte N-Terminus in das ER-Lumen und wird somit zugänglich zur N-Glykosylierungsmaschinerie. Durch die N-Glykosylierung nach Translokation des N-Terminus bei der Initiation von ERAD ist eine Bande mit etwas höherem Molekulargewicht im Gel zu sehen. Falls allerdings der cotranslationale Import verlangsamt ist, wird die Glykosylierung verzögert und die unglykosylierte Bande wird etwas prominenter. Dabei kommt es auch zu einem Wechsel von dem Hrd1-Weg zu dem Doa10-Weg und die Degradation läuft schneller ab (Rubenstein et al., 2012).

Diesen Effekt konnte ich auch in den ERAD-kompetenten, ER-Import-defekten *sec63*-Mutanten beobachten (siehe Abb. 3.27). Besonders in *sec63-404* Brl und *sec63-405* Transmembrandomäne verkürzte sich die  $t_{1/2}$  von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 3.27). In diesen Mutanten ist es wahrscheinlich zu dem Wechsel zum Doa10-Weg gekommen. Ein ERAD-Defekt konnte in keiner dieser Mutanten festgestellt werden (siehe Abb. 3.27). Auch in der C-terminalen Deletionsmutante *sec63-201* konnte kein ERAD-Defekt beobachtet werden (siehe Abb. 3.26). Die Degradationsrate von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> war auch in *sec63-201* leicht erhöht im Vergleich mit dem Wildtyp, was wahrscheinlich auf die gestörte Interaktion zwischen Sec63-201p und Sec62p zurückzuführen ist (siehe Abb. 3.26). Dies passt zu den Beobachtungen in Rubenstein et al., 2012. Die Autoren konnten in *sec63-201* eine Verzögerung der Degradation von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> feststellen, sowie einen Wechsel zum Doa10-Weg und eine verlangsamte Glykosylierung von Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> (Rubenstein et al., 2012).

Die ERAD-Substrate KHN und KWW wurden bereits in den Publikationen von Vashist und Kollegen verwendet (Vashist et al., 2001; Vashist & Ng, 2004). Es handelt sich dabei um Proteinchimären aus der Signalsequenz von Kar2p, die co- und posttranslationalen Import vermitteln kann, und dem Virusprotein Hämagglutinin Neuraminidase, dem bei KWW noch zusätzlich die Transmembrandomäne des Plasmamembranproteins Wsc1p angefügt wurde (Vashist et al., 2001; Vashist & Ng, 2004). ERAD dieser Substrate habe ich in *sec63-201* und *sec63-402* untersucht (siehe Abb. 3.29 und Abb. 3.30). Leider konnte ich in *sec63-402*-Zellen kein KWW detektieren, weshalb ich in dieser Mutante nur ERAD von KHN untersuchen konnte. Es scheint unwahrscheinlich, dass der Importdefekt in *sec63-402* für die mangelnde KWW-Expression verantwortlich ist, da *sec63-201* einen viel stärkeren Import-Defekt auch cotranslational aufweist (Ng et al., 1996). Möglicherweise sind die Expressionsunterschiede auf den unterschiedlichen Stammhintergrund zurückzuführen.

In *sec63-201* und *sec63-402* Mutanten konnte eine Verlängerung der  $t_{1/2}$  von 35 min im Wildtyp auf 45 min nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.29 und Abb. 3.30). Für KWW war in *sec63-201* kein Degradationsdefekt erkennbar (siehe Abb. 3.29). Bei der Degradation dieser Substrate werden beide zuerst in den Golgi-Apparat transportiert, bevor sie retrograd zum ER befördert werden, wo ihre Degradation erfolgt (Vashist et al., 2001). Beide ERAD-Substrate werden bei dem Transport in den Golgi-Apparat glykosyliert, weshalb die Laufgeschwindigkeit des Proteins im Gel bei den späteren Zeitpunkten etwas langsamer ist und eine undeutliche verschwommene Bande gebildet wird (Vashist et al., 2001). Diese ist in den Stämmen *sec63-201* und *sec63-402* deutlich sichtbar (siehe Abb. 3.29 und Abb. 3.30). Also ist auch bei dem luminalen ERAD-Substrat KHN unabhängig vom posttranslationalen

Import eine langsamere Degradation der Fall. Das heißt, ERAD in *sec63-402* ist verlangsamt für alle löslichen Substrate, auch solche, die wie KHN cotranslational importiert werden können, und die im Golgi poly-mannosyliert worden sind. Da in *sec63-201* der ERAD von CPY\* nicht untersucht werden konnte, ist ein verlangsamer ERAD eines löslichen Substrats in *sec63-201* nur mit KHN gezeigt (siehe Abb. 3.17 und Abb. 3.29). Vermutlich beruht der verlangsamte ERAD von KHN in *sec63-201* aber auf einer Konformationsänderung dieser Mutante, die die DnaJ-Domäne beeinflusst. Da keine der anderen Mutanten mit Mutationen im Bereich der C-terminalen Deletion von *sec63-201* (*sec63-404* und *sec63-406*) eine Beeinträchtigung des ERAD eines löslichen Substrats zeigen.

Als Beispiel für ein polytopes ERAD-Substrat habe ich Sec61-2p verwendet, das 10 Transmembrandomänen besitzt (Vashist et al., 2001). Die Degradation dieses Proteins war in den einzelnen *sec63*-Mutanten sehr heterogen (siehe Abb. 3.31). Bereits der Wildtyp-Stamm zeigte eine deutlich langsamere  $t_{1/2}$  mit 24 min als die 12 min, die für dieses Protein publiziert sind, was möglicherweise auf den Stammhintergrund zurückzuführen ist (siehe Abb. 3.31 und Vashist & Ng, 2004). Überraschenderweise degradierten *sec63-404* saure Domäne und vor allem *sec63-402* dieses Protein wesentlich schneller als der Wildtyp mit jeweils 14 und 10 min (siehe Abb. 3.31). Die Mutanten *sec63-405* Transmembrandomäne und *sec63-404* Brl hatten hingegen während der ersten 30 min dieses Experiments kaum die Hälfte des Substrats degradiert, wobei die *sec63-405* Transmembrandomäne noch langsamer war als die Brl-Mutante (siehe Abb. 3.31). Diese sehr unterschiedlichen Degradationszeiten sind möglicherweise auf mehrere Faktoren zurückzuführen: Einer davon ist wahrscheinlich die unterschiedlich hohe UPR-Induktion der verschiedenen Hefestämme (siehe Abb. 3.14). Die sehr starke Aktivität in *sec63-402* könnte zu einem schnelleren Abbau dieses polytopen Substrats beitragen (siehe Abb. 3.14).

Ein anderer Faktor, der zu den heterogenen  $t_{1/2}$  von Sec61-2p beiträgt, ist möglicherweise die gestörte Interaktion von Sec63p mit dem Sec61-Komplex, der durch die Mutante Sec61-2p beeinträchtigt sein könnte und dadurch einen Einfluss auf die Sec61-2p-Degradation nehmen könnte. Diese Interaktion ist vielleicht durch eine veränderte Konformation des *sec63*-Proteins in *sec63-405* zurückzuführen, das eine Punktmutation in der ersten Transmembrandomäne trägt, was auch bereits zu einem starken posttranslationalen Importdefekt geführt hat (siehe Abb. 3.12). Die Vermutung, dass die Brl-Domäne hier von entscheidender Bedeutung ist für die Interaktion mit Sec61-2p, wird auch durch die langsamere Degradation von Sec61-2p in der Brl-Mutante unterstützt (siehe Abb. 3.31). Die Datenlage spricht in diesem Fall eher dafür, dass diese Degradationseffekte nicht die gleiche Ursache haben wie die zuvor erwähnten Effekte von *sec63* bei den löslichen Substraten.

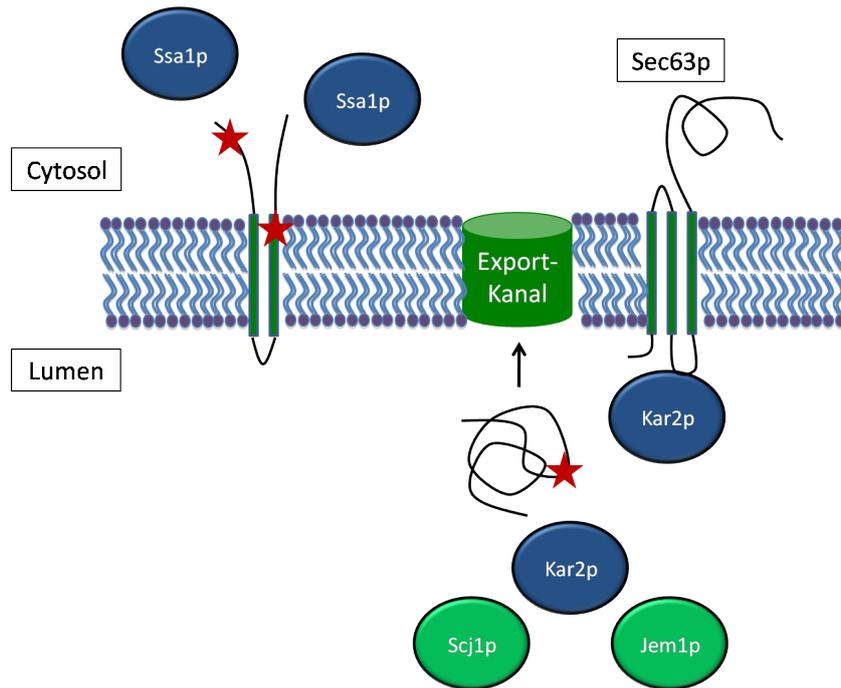


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Degradation von löslichen und transmembranen ERAD-Substraten

In dieser Abbildung wird die Degradation von verschiedenen ERAD-Substraten im Bereich der ER-Membran dargestellt. In der rechten Bildhälfte wird der Export eines luminalen fehlgefalteten Proteins durch Interaktion mit dem Chaperon Kar2p gezeigt, der durch die DnaJ-Proteine Sec63p, Jem1p und Scj1p reguliert wird (unbekannter Exportkanal ist als grüner Zylinder markiert). Die Mutation oder Fehlfaltung des Proteins wird durch den roten Stern angezeigt. In der linken Bildhälfte wird angedeutet, dass die Degradation von transmembranen ERAD-Substraten von Ssa1p abhängig ist.

Es ist bekannt, dass verschiedene Chaperone in die Degradation von Proteinen involviert sind, allerdings besitzen diese Chaperone eine Substratspezifität (Fewell et al., 2001). So wurde nachgewiesen, dass das Hsp70 Chaperon Ssa1p und die Hsp40 Chaperone Ydj1p und Hdj1p, die alle cytosolisch lokalisiert sind, an der Degradation von verschiedenen integralen Membranproteinen beteiligt sind, zum Beispiel ist Ssa1p an dem ERAD des 12 Transmembranproteins Ste6p\* involviert (Fewell et al., 2001). Für Kar2p hingegen konnte bisher nur eine Beteiligung bei der Degradation von löslichen Proteinen nachgewiesen werden (Nakatsukasa et al., 2008; Nishikawa et al., 2005). Dies trifft auch auf die anderen luminalen DnaJ-Proteine Jem1p und Scj1p zu, die Interaktionspartner von Kar2p sind (Nishikawa et al., 2001). Zu diesem Substratmuster passen auch die Daten aus dieser Arbeit, bei der Sec63p einen Effekt nur bei der Degradation von löslichen Proteinen zeigt (siehe Abb. 4.1).

Für Sec61p wurde eine Rolle bei dem retrograden Transport während des ERAD von einigen Substraten nachgewiesen (Plemper et al., 1999b; Wiertz et al., 1996). Da aber keine *sec63*-Mutante einen Degradationsdefekt von CPY\* aufzeigte, die eine Mutation im Interaktionsbereich mit dem Sec61-Komplex trug, kann eine Beeinträchtigung des ERAD durch gestörte Sec63p-Sec61p-Interaktion weitgehend ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.16). Zusätzlich zeigten die Mutanten mit Mutationen im Interaktionsbereich von Sec62p ebenfalls keine Beeinträchtigung des ERAD des löslichen CPY\* (siehe Abb. 3.16).

## 4.5 Strukturelle Effekte der Mutationen in der DnaJ-Domäne von *sec63-401* und *sec63-402*

Die DnaJ-Domäne ist eine hochkonservierte Region, die zur Interaktion mit Hsp70-Proteinen dient, wodurch deren ATP-Hydrolyse-Aktivität reguliert wird (Georgopoulos et al., 1980). Die DnaJ-Domäne besteht aus vier Helices, die über Schleifen miteinander verbunden sind (siehe Abb. 4.2 und Walsh et al., 2004). Zwischen Helix II und Helix III liegt das HPD-Motiv, das von essentieller Bedeutung für die Interaktion mit Hsp70-Proteinen ist (Greene et al., 1998; Qian et al., 1996). Die Mutationen in den DnaJ-Domänen der Mutanten *sec63-401* und *sec63-402* liegen in der lysinreichen Helix II (siehe für *sec63-402* Abb. 4.2). Der Austausch eines Serins durch ein Phenylalanin an Stelle 143 in *sec63-401* hatte keinen auffälligen Effekt auf ERAD, Temperatur- bzw. Stresssensitivität oder Proteinimport (siehe Abb. 3.7, Abb. 3.11 und Abb. 3.16). An dieser Stelle befindet sich in den meisten DnaJ-Domänen Proteinen ein Lysin wie z. B. in Jem1p (siehe Abb. 4.2). Diese Stelle kann aber auch durch ein Serin (Sec63p, Scj1p), ein Isoleucin oder ein Threonin besetzt sein (Walsh et al., 2004). In *sec63-402* ist an Stelle 140 ein saures Aspartat durch ein hydrophobes Valin ausgetauscht (siehe Abb. 4.2). Die meisten DnaJ-Domänen Proteine inklusive Scj1p und Jem1p besitzen an dieser Position eine saure Aminosäure (Walsh et al., 2004). Sie befindet sich direkt neben einer hochkonservierten Stelle, an der sich ein hydrophobes Isoleucin befindet (Walsh et al., 2004). Diese Lokalisierung ist wichtig für die Stabilisierung und Packung der Helix (Walsh et al., 2004). Es ist möglich, dass durch diese hydrophobe Aminosäure an dieser Position in *sec63-402* die Packung der Helix II gestört wird und dadurch die Position des HPD-Motivs verändert wird (siehe Abb. 4.2). Möglicherweise hat dies Auswirkungen auf die Interaktion von *sec63-402* mit Kar2p. Die Interaktion von Sec63-402p mit Kar2p muss aber noch experimentell verifiziert werden.

DnaJ-Domänen Proteine übernehmen in der Zelle unterschiedliche Aufgaben (Walsh et al., 2004). Dies steht oft in Verbindung mit ihren charakteristischen Merkmalen nach de-

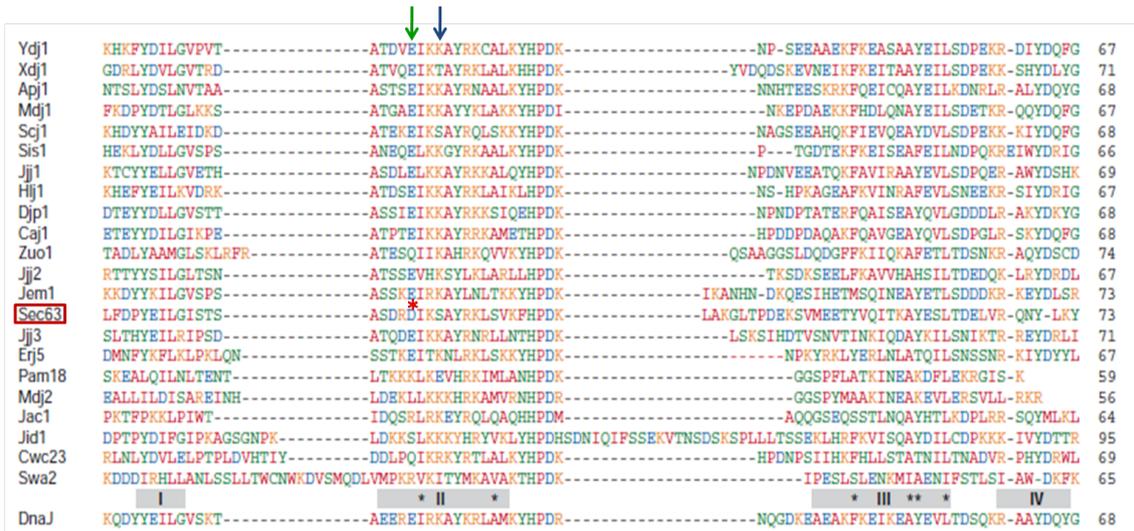


Abbildung 4.2: Sequenzvergleich der DnaJ-Domänen verschiedener Hefe-Proteine

In dieser Abbildung wird die DnaJ-Domäne von 22 Hefeproteinen verglichen. Die Aminosäuren sind nach folgendem Schema farbcodiert: orange: basisch; blau: sauer; grün: polar; rot: nicht-polar. Die vier verschiedenen helicalen Bereiche sind durch graue Balken angegeben. Die schwarzen Sterne markieren hydrophobe Aminosäuren, die wichtig sind zur Stabilisierung der Helices. Die Zahlen geben die Länge der einzelnen DnaJ-Domänen an. Sec63p wurde durch ein rotes Rechteck hervorgehoben. Der rote Stern markiert die mutierte Position in *sec63-402*. Der grüne Pfeil markiert Position 140, der blaue Pfeil Position 143 (verändert nach Walsh et al., 2004).

nen die Proteine in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Cheetham & Caplan, 1998). Scj1p ist ein Typ I Protein und zusammen mit Kar2p an der Regulation der Faltung von Proteinen beteiligt, so dass sie nicht aggregieren und in einem Export-kompetenten Zustand gehalten werden (Silberstein et al., 1998). Sec63p ist ein Typ III Protein, das Kar2p am Ort seiner Aktivität, dem Translokon, verankert (Walsh et al., 2004; Nishikawa et al., 2001).

In meiner Arbeit habe ich gezeigt, dass Sec63p dabei nicht nur am Import von neuen Proteinen ins ER, sondern auch am Export von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER beteiligt ist. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch mit Daten, welche in Vembar et al., 2010 veröffentlicht wurden (Vembar et al., 2010). Die Autoren zeigten, dass ein mutiertes Kar2p, dessen Interaktion mit Sec63p stark vermindert ist (R217A), aber nicht die mit Jem1p, keinen Effekt auf ERAD von zwei löslichen Proteinen (CPY\* und  $\Delta$ gpaF) zeigte, sondern nur auf den Proteinimport (Vembar et al., 2010). Eine Mutation in dem Substrat-Interaktionsbereich von Kar2p war jedoch defekt bezüglich der Degradation beider Substrate (Vembar et al., 2010). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass für den Proteinimport die Interaktion von Sec63p und Kar2p limitierend ist, da die Bindung von Kar2p an den Transportkanal das Chaperon in die Nähe zu dem zu transportierenden Substrat bringt und daher die Affinität von Kar2p an

das Substrat weniger kritisch wird. Für den Export von löslichen Proteinen ins Cytosol ist die Interaktion von Kar2p und dem Exportsubstrat limitierend, da ein Verlust dieser Interaktion in Verlust der Exportkompetenz, Proteinaggregation und einem ERAD-Defekt resultiert. Aber sogar in diesem Fall würde man einen Effekt auf ERAD bei verminderter Affinität von Kar2p zu Sec63p erwarten. In den Pulse-Chase-Experimenten, die Vembar et al. zur Analyse von ERAD in der R217A Mutante verwendeten, wurde eine extrem lange Pulse-Zeit gewählt (10 min) im Vergleich zu unserer (2 min) (Vembar et al., 2010). Außerdem war die  $t_{1/2}$  von CPY\* in ihrem Wildtyp mit etwa 40 min ungewöhnlich lang, verglichen mit den Literaturwerten und unseren Experimenten (20 min) (siehe 3.16; Finger et al., 1993; Vembar et al., 2010). Es wäre deshalb möglich, dass moderate Effekte auf die CPY\*-Degradation in diesen Experimenten übersehen wurden.

Die Autoren untersuchten ebenfalls  $\Delta$ gp $\alpha$ F-Degradation in einem zellfreien System basierend auf Hefemikrosomen und Cytosol und fanden keinen Defekt in den Membranen der *kar2* R217A-Mutante (Vembar et al., 2010). In diesem *in vitro* Assay wurde die Importzeit, um die Mikrosomen mit dem Substrat zu beladen, viel länger gewählt (1 h), als notwendig ist, um den Import abzuschließen (10-15 min) (Vembar et al., 2010; Pilon et al., 1997). Diese verlängerte Importzeit ist essentiell für anschließenden Export und Degradation in Gegenwart von Cytosol (McCracken & Brodsky, 1996; Pilon et al., 1997). Falls es der Zweck der Sec63p/Kar2p Interaktion in ERAD ist, Substrate zur Exportmaschinerie zu führen, könnte dieser Vorgang während der Importreaktion in den zellfreien ERAD-Assay bereits abgeschlossen sein. Außerdem ist es vorstellbar, dass die Sec63p Interaktion bei Fehlen von konkurrierendem Import für ERAD nicht limitierend ist und daher die verminderte Affinität der *kar2* R217A-Mutante keinen Exportdefekt verursachten. Es ist außerdem nicht möglich die Rollen von essentiellen und nicht-essentiellen DnaJ-Domänen Proteinen zu vergleichen in Stämmen, in denen Erstere deletiert und Letztere durch Punktmutationen geschwächt sind, da diese Mutanten nie komplett funktionsuntüchtig sind und deshalb schwächere Phänotypen ausprägen als die Deletion.

## **4.6 Auswirkungen von Depletion und Überexpression von Sec63p auf die Degradation von ERAD-Substraten**

In Madés et al., 2012 wird beschrieben, dass bei Überexpression von Sec63p in Säuger-Zellen der „steady state“-Level von polytopischen Membranproteinen in der ER-Membran reduziert

und bei Sec63p-Depletion höher reguliert wird (Mades et al., 2012). Jedoch liegt bei Mades ein anderer Mechanismus zu Grunde als bei ERAD, da die Verminderung der Proteinmenge unabhängig von Proteasomen ist (Mades et al., 2012). Die beobachteten Effekte in Mades et al., 2012 werden also nicht durch ERAD verursacht sondern eher durch Importregulation.

In meiner Arbeit habe ich den Effekt von überexprimiertem und depletiertem Sec63p auf ERAD von CPY\* und Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> untersucht (siehe Abb. 3.22, Abb. 3.23 und Abb. 3.28). Bei der Sec63p-Überexpression konnte eine marginal schnellere Degradationsrate von CPY\* beobachtet werden (siehe Abb. 3.22). Aber dieser Effekt war schwach im Vergleich zu den von Mades et al., 2012 beobachteten Effekten. Bei Deg1::Sec62<sup>ProtA</sup> konnte keine veränderte Degradationsrate bei Sec63p-Überexpression festgestellt werden (siehe Abb. 3.28).

Für die Sec63p-Depletion habe ich den in Young et al., 2001 beschriebenen Stamm verwendet (Young et al., 2001). Es konnte zwar eine etwas langsamere Degradationsrate von CPY\* von 28 min auf 35 min gezeigt werden, bei einer Verminderung des Sec63p-Gehalts um etwa die Hälfte, jedoch war gleichzeitig der co- und posttranslationale Import so schwer inhibiert, dass nur ein geringer Teil des CPY\* überhaupt ins ER-Lumen transportiert wurde (siehe Abb. 3.23). Dadurch war mit großer Wahrscheinlichkeit die gesamte Proteinhomöostase dieses Stammes so schwer gestört, dass man mit diesem Assay keine verlässliche Aussage über die Rolle der Menge von Sec63p in ERAD treffen kann. Der Sec63p-„steady state“-Level in meinen Mutanten konnte ich mit unserem Antikörper nicht bestimmen, da dieser in der DnaJ-Domäne bindet und diese Interaktion wahrscheinlich durch die Mutationen in diesem Bereich gestört wird. Es ist aber unwahrscheinlich, dass der Expressionslevel von *sec63-402* die Ursache für die beobachteten Degradationsdefekte darstellt, da der Import nicht beeinträchtigt war, wie es bei der Depletion von Sec63p zu sehen war (siehe Abb. 3.16 und Abb. 3.28). Sec63p ist in Mammalia nicht essentiell, weshalb dort eine Depletion von Sec63p möglich ist, ohne das Überleben der Zellen stark zu beeinträchtigen (Mades et al., 2012; Lang et al., 2012).

Die Funktionen von Sec63p haben sich vermutlich im Laufe der Evolution verändert, wie es auch bei Sec62p der Fall ist (Müller et al., 2010). Müller et al., 2010 zeigten, dass das Prinzip der Interaktion von Sec62p und Sec63p in Hefe und Mammalia gleich sind. Anders als das Hefe-Homolog interagiert Säuger-Sec62 aber zusätzlich mit dem Ribosom in Bereich des Tunnel-Exits (Müller et al., 2010). Bei Sec63p scheint sich seine Rolle im Transport geändert zu haben. In Hefe spielt es eine Rolle beim Transport löslicher Proteine ins und aus dem ER, in Säugern scheint es sich um eine Art Chaperon für Transmembranproteine während der Biogenese zu handeln.

## 4.7 Kontext zu *SEC63*-bezogenen Krankheitsbildern

Mutationen in *SEC63* und in *PRKCSH*, das die  $\beta$ -Untereinheit der Glukosidase II ( $\beta$ GII) codiert, sind in dem Krankheitsbild der ADPLD, bei der viele ephitheliale Cysten biliären Ursprungs in der Leber gebildet werden, involviert (Fedeles et al., 2011). Die ADPLD kann als eigenständiges Krankheitsbild auftreten, aber auch zusammen mit der ADPKD (Davila et al., 2004). Wodurch genau Mutationen in *SEC63* zu ADPLD im Menschen führen, ist noch nicht klar. Verschiedene Theorien sind plausibel, z.B. könnte Sec63 und Glukosidase II (auch Hepatocystin genannt) in der Expression und dem Transport eines oder mehrerer Proteinen notwendig sein, die für die Kontrolle der Zellteilung der biliären Zellen notwendig sind. In Übereinstimmung mit diesem Model konnten Fedeles und Kollegen zeigen, dass Sec63 und  $\beta$ GII bei der Expression des Polycystin 1/Polycystin 2-Komplexes (PC1/PC2) bei der ADPKD involviert sind (Fedeles et al., 2011). Die ADPKD wird durch Mutationen in den Genen *PKD1* und *PKD2* ausgelöst, die für die polytopen Proteine PC1 (11 TM-Domänen) und PC2 (6 TM-Domänen) codieren (Peters & Sandkuijl, 1992; Nims et al., 2003). Beide Proteine bilden bei gemeinsamer Expression einen Komplex im ER (Grimm et al., 2003). Bei Mutation in *SEC63* und in *PRKCSH* kommt es zu einer Abnahme des Proteinlevels von PC1, wodurch es zu einer stärkeren Ausdehnung der Nierentubuli und zu weiterem Cystenwachstum kommt (Fedeles et al., 2011; Janssen et al., 2012). Die unterschiedlichen Krankheitsbilder der ADPKD und ADPLD interpretieren Fedeles et al., 2011 so, dass ADPKD durch einen kompletten somatischen Verlust von *PKD1* und *PKD2* verursacht wird, wohingegen Mutationen in *SEC63* und in *PRKCSH* eine Verminderung der Expression von PC1 nach sich zieht, was Cystenbildung verursacht (Fedeles et al., 2011). Hier hat also Sec63, wie schon in Mades et al., 2012 nachgewiesen, einen Einfluss auf die Expression eines polytopen Proteins. Jedoch wird in Fedeles et al., 2011, der Level des polytopen PC1 durch Mutation in *SEC63* vermindert und nicht erhöht, wie Mades et al., 2012 beobachtet. Mades und Kollegen führen diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Beobachtungen auf die Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit von manchen cotranslational importierten Proteinen von Sec63 zurück. Diese Sec63-Abhängigkeit könnte in Zusammenhang mit einer spaltbaren Signalsequenz stehen (Lang et al., 2012), da PC1 über eine solche spaltbare Signalsequenz verfügt und PC2 nicht (Mades et al., 2012).

Eine andere Möglichkeit wie mutiertes Sec63p zu ADPLD führen kann, bezieht sich auf die Funktion von Sec63p andere Proteine an der ER-Membran zu verankern. Denn Sec63p konnte eine Interaktion mit dem cytosolischen Nucleoredoxin nachgewiesen werden, das mit Dishevelled 1 interagiert, welches in den Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg und den Wnt/planare

Zellpolaritäts-Signalweg involviert ist (Müller et al., 2011). Diese Signalwege werden durch die Interaktion von Dishevelled 1 mit Nucleoredoxin negativ reguliert (Funato & Miki, 2010). Vor Kurzem hat man außerdem eine Verbindung mit Störungen bei der Myelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem und ein vergrößertes ER in myelinisierenden Gliazellen im Zebrafisch festgestellt (Monk et al., 2013). Die UPR ist in den untersuchten *sec63*-Mutanten ebenfalls hochreguliert (Monk et al., 2013). Die erhöhte UPR und das vergrößerte ER deuten in diesem Fall auf Zellstress hin (Monk et al., 2013). Jedoch kann man aufgrund der Importregulation durch Sec63 in Vertebraten und im Vergleich dazu die Beteiligung von Sec63p in Hefe beim ERAD (siehe Abb. 3.16) festhalten, dass die Hefe zur Erforschung der Rolle von Sec63p in humanen Krankheiten nicht geeignet ist, da Sec63p offensichtlich in Vertebraten eine teilweise abgewandelte Funktion zu Hefe innehat.

# Veröffentlichungen

## Poster

The Role Of SEC63 In ER-Associated Degradation, ASCB Meeting, Philadelphia, Dezember 2010

The Role Of SEC63 In ER-Associated Degradation, EMBO Meeting, Dubrovnik, März 2013

## Publikation

Servas C, & Römisch K (2013), „The Sec63p J-Domain Is Required for ERAD of Soluble Proteins in Yeast“ *PloS One*, 8: e82058.

# Literaturverzeichnis

- Bays, N, S Wilhovsky, A Goradia, K Hodgkiss-Harlow, & R Hampton (2001), "HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins." *Mol. Biol. Cell*, 12, 4114–4128.
- Bertolotti, A, Y Zhang, L Hendershot, H Harding, & D Ron (2000), "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat. Cell Biol.*, 2, 326–32.
- Biederer, T., C Volkwein, & T Sommer (1997), "Role of Cue1p in Ubiquitination and Degradation at the ER Surface." *Science*, 278, 1806–1809.
- Blobel, G & B Dobberstein (1975), "membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma." *J. Cell Biol.*, 67, 835–851.
- Boeke, J, J Trueheart, G Natsoulis, & G Fink (1987), "5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics." *Methods Enzym.*, 154, 164–175.
- Brode, S, S Ling, & K Chapman (2012), "Alpha-1 antitrypsin deficiency: a commonly overlooked cause of lung disease." *CMAJ*, 184, 1365–1371.
- Brodsky, J, J Goeckeler, & R Schekman (1995), "BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 9643–9646.
- Brodsky, J & R Schekman (1993), "A Sec63p-BiP Complex from Yeast Is Required for Protein Translocation in a Reconstituted Proteoliposome." *J. Cell Biol.*, 123, 1355–1363.
- Buschhorn, B, Z Kostova, B Medicherla, & D Wolf (2004), "A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins." *FEBS Lett.*, 577, 422–426.

- Bush, G, A Tassinq, H Fridenll, & D Meyer (1991), "Secretion in Yeast." *J. Cell Biol.*, 266, 13811–13814.
- Cadwell, R & G Joyce (1992), "Randomization of genes by PCR mutagenesis." *Genome Res.*, 2, 28–33.
- Caramelo, J & A Parodi (2008), "Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles." *J. Biol. Chem.*, 283, 10221–10225.
- Carvalho, P, V Goder, & T Rapoport (2006), "Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins." *Cell*, 126, 361–373.
- Cheetham, M & A Caplan (1998), "Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function." *Cell Stress Chaperones*, 3 (1), 28–36.
- Chen, Y, D Feldman, C Deng, J Brown, A De Giacomo, A Gaw, G Shi, Q Le, J M Brown, & A Koong (2005), "Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cancer Res.*, 3, 669–677.
- Chirico, W, M Waters, & G Blobel (1988), "70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes." *Nature*, 332, 805–810.
- Ciechanover, A, Y Hod, & A Hershko (1978), "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425, 565–570.
- Clerc, S, C Hirsch, D Oggier, P Deprez, C Jakob, T Sommer, & M Aebi (2009), "Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum." *J. Cell Biol.*, 184, 159–172.
- Corsi, A & R Schekman (1997), "The Luminal Domain of Sec63p Stimulates the ATPase Activity of BiP and Mediates BiP Recruitment to the Translocon in." 137, 1483–1493.
- Cox, J, C Shamu, & P Walter (1993), "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." *Cell*, 73, 1197–1206.
- Cox, J & P Walter (1996), "A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response." *Cell*, 87, 391–404.

- Credle, J, J Finer-Moore, F Papa, R Stroud, & P Walter (2005), "On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 18773–84.
- Cruciat, C, C Hassler, & C Niehrs (2006), "The MRH protein Erlectin is a member of the endoplasmic reticulum synexpression group and functions in N-glycan recognition." *J. Biol. Chem.*, 281, 12986–12993.
- Dafforn, T, R Mahadeva, P Elliott, P Sivasothy, & D Lomas (1999), "A Kinetic Mechanism for the Polymerization of alpha 1-Antitrypsin." *J. Biol. Chem.*, 274, 9548–9555.
- Davila, S, L Furu, A Gharavi, X Tian, T Onoe, Q Qian, A Li, Y Cai, P Kamath, B King, P Azurmendi, P Tahvanainen, H Kääriäinen, K Höckerstedt, O Devuyst, Y Pirson, R Martin, R Lifton, E Tahvanainen, V Torres, & S Somlo (2004), "Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease." *Nat. Genet.*, 36, 575–577.
- Delic, M, M Valli, A Graf, M Pfeffer, D Mattanovich, & B Gasser (2013), "The secretory pathway: exploring yeast diversity." *FEMS Microbiol. Rev.*, 1–43.
- Denic, V, E Quan, & J Weissman (2006), "A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation." *Cell*, 126, 349–359.
- Deshaies, R, S Sanders, D Feldheim, & R Schekman (1991), "Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex." *Lett. to Nat.*, 349, 806–08.
- Deshaies, R & R Schekman (1990), "Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery." *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6024–6035.
- Esnault, Y, D Feldheim, M Blondel, R Schekman, & F Képès (1994), "SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus." *J. Biol. Chem.*, 269, 27478–27485.
- Fedeles, S, X Tian, A Gallagher, M Mitobe, S Nishio, S Lee, Y Cai, L Geng, C Crews, & S Somlo (2011), "A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation." *Nat. Genet.*, 43, 639–647.

- Feldheim, D, J Rothblatt, & R Schekman (1992), "Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation." *Mol. Cell. Biol.*, 12, 3288–3296.
- Feldheim, D & R Schekman (1994), "Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex." *J. Cell Biol.*, 126, 935–943.
- Feldheim, D, K Yoshimura, A Admon, & R Schekman (1993), "Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum." *Mol. Biol. Cell*, 4, 931–9.
- Fewell, S, K Travers, J Weissman, & J Brodsky (2001), "The action of molecular chaperones in the early secretory pathway." *Annu. Rev. Genet.*, 35, 149–191.
- Finger, A, M Knop, & D Wolf (1993), "Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast." *Eur. J. Biochem.*, 218, 565–574.
- Finke, K, K Plath, S Panzner, S Prehn, T Rapoport, E Hartmann, & T Sommer (1996), "A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*." *EMBO J.*, 15, 1482–94.
- Finley, D, H Ulrich, T Sommer, & P Kaiser (2012), "The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, 192, 319–60.
- Flaherty, K, C DeLuca-Flaherty, & D McKay (1990), "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein." *Nature*, 346, 623–628.
- Friedlander, R, E Jarosch, J Urban, C Volkwein, & T Sommer (2000), "A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response." *Nat. Cell Biol.*, 2, 379–384.
- Funato, Y & H Miki (2010), "Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin." *Free Radic. Res.*, 44, 379–388.
- Gardner, B, D Pincus, K Gotthardt, C Gallagher, & P Walter (2013), "Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response." *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a013169.

- Gentzsch, M, T Immervoll, & W Tanner (1995), "Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein O-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer." *FEBS Lett.*, 377, 128–130.
- Georgopoulos, C, A Lundquist-Heil, J Yochem, & M Feiss (1980), "Identification of the *E. coli* dnaJ gene product." *Mol Gen Genet.*, 178, 583–588.
- Ghaemmaghami, S, W Huh, K Bower, R Howson, A Belle, N Dephoure, E O'Shea, & J Weissman (2003), "Global analysis of protein expression in yeast." *Nature*, 425, 737–741.
- Girão, H, P Pereira, A Taylor, & F Shang (2005), "Subcellular redistribution of components of the ubiquitin–proteasome pathway during lens differentiation and maturation." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 1386–1392.
- Green, N, H Fang, & P Walter (1992), "Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Cell Biol.*, 116, 597–604.
- Greene, E, C Codomo, N Taylor, J Henikoff, B Till, S Reynolds, L Enns, C Burtner, J Johnson, A Odden, L Comai, & S Henikoff (2003), "Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*." *Genetics*, 164, 731–40.
- Greene, M, K Maskos, & S Landry (1998), "Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 6108–6113.
- Grimm, D, Y Cai, V Chauvet, V Rajendran, R Zeltner, L Geng, E Avner, W Sweeney, S Somlo, & M Caplan (2003), "Polycystin-1 distribution is modulated by polycystin-2 expression in mammalian cells." *J. Biol. Chem.*, 278, 36786–36793.
- Groll, M, M Bochtler, H Brandstetter, T Clausen, & R Huber (2005), "Molecular machines for protein degradation." *Chembiochem*, 6, 222–256.
- Guarente, L (1983), "Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast." *Methods Enzym.*, 101, 181–191.
- Hanahan, D (1985), "Techniques for transformation of *E. coli*." *DNA cloning a Pract. approach* (Glover, D. M., ed), 1, 109–135.
- Harada, Y, H Li, J Wall, & W Lennarz (2011), "Structural Studies and the Assembly of the Heptameric Post-translational Translocon Complex \*." *J. Biol. Chem.*, 286, 2956–2965.

- Harding, H, Y Zhang, & D Ron (1999), "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." *Nature*, 397, 271–274.
- Haze, K, H Yoshida, H Yanagi, T Yura, & K Mori (1999), "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." *Mol. Biol. Cell*, 10, 3787–3799.
- Helenius, A & M Aebi (2004), "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 1019–1049.
- Hershko, A & A Ciechanover (1980), "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 1783–1786.
- Hitt, R & D Wolf (2004), "DER7, encoding alpha-glucosidase I is essential for degradation of malformed glycoproteins of the endoplasmic reticulum." *FEMS Yeast Res.*, 4, 815–820.
- Hochstrasser, M & A Varshavsky (1990), "In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor." *Cell*, 61, 697–708.
- Hou, J, K Tyo, Z Liu, D Petranovic, & J Nielsen (2012), "Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res.*, 12, 491–510.
- Huyer, G, W Piluek, Z Fansler, S Kreft, M Hochstrasser, J Brodsky, & S Michaelis (2004), "Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein." *J. Biol. Chem.*, 279, 38369–38378.
- Ismail, N & D Ng (2006), "Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble!" *Cell*, 126, 237–9.
- Ito, H, Y Fukuda, & K Murata (1983), "Transformation of intact yeast cells treated with alkali Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations." *J. Bacteriol.*, 153, 163–168.
- Jakob, C, D Bodmer, U Spirig, & P Bättig (2001), "Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast." *EMBO Rep.*, 2, 423–430.
- Jakob, C, P Burda, J Roth, & M Aebi (1998), "Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure." *J. Cell Biol.*, 142, 1223–1233.

- Janke, C, M Magiera, N Rathfelder, C Taxis, S Reber, H Maekawa, A Moreno-Borchart, G Doenges, E Schwob, E Schiebel, & M Knop (2004), "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." *Yeast*, 21, 947–962.
- Janssen, M, J Salomon, R Te Morsche, & J Drenth (2012), "Loss of heterozygosity is present in SEC63 germline carriers with polycystic liver disease." *PLoS One*, 7, e50324.
- Jentsch, S & S Rumpf (2007), "Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway?" *Trends Biochem. Sci.*, 32, 6–11.
- Jermy, A, M Willer, E Davis, B Wilkinson, & C Stirling (2006), "The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons." *J. Biol. Chem.*, 281, 7899–7906.
- Johnson, N, S Hassdenteufel, M Theis, A Paton, J Paton, R Zimmermann, & S High (2013), "The Signal Sequence Influences Post-Translational ER Translocation at Distinct Stages." *PLoS One*, 8, e75394.
- Jonikas, M, S Collins, V Denic, E Oh, E Quan, V Schmid, J Weibezahn, B Schwappach, P Walter, J Weissman, & M Schuldiner (2009), "Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum." *Science*, 323, 1693–1697.
- Jung, G, H Ueno, & R Hayashi (1999), "Carboxypeptidase Y: structural basis for protein sorting and catalytic triad." *J. Biochem.*, 126, 1–6.
- Kabani, M, S Kelley, M Morrow, D Montgomery, R Sivendran, M Rose, L Gierasch, & J Brodsky (2003), "Dependence of Endoplasmic Reticulum-associated Degradation on the Peptide Binding Domain and Concentration of BiP." *Mol. Biol. Cell*, 14, 3437–3448.
- Kanehara, K, S Kawaguchi, & D Ng (2007), "The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors." *Semin. Cell Dev. Biol.*, 18, 743–750.
- Keenan, R, D Freymann, R Stroud, & P Walter (2001), "The signal recognition particle." *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 755–775.
- Kelleher, D & R Gilmore (2006), "An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase." *Glycobiology*, 16, 47R–62R.

- Kerem, B, J Zielenski, D Markiewicz, D Bozon, E Gazit, J Yahav, D Kennedy, J Riordan, F Collins, & J Rommens (1990), "Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87, 8447–8451.
- Kim, W, E Spear, & D Ng (2005), "Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation." *Mol. Cell*, 19, 753–764.
- Klausner, R & R Sitia (1990), "Protein degradation in the endoplasmic reticulum." *Cell*, 62, 611–614.
- Knop, M, A Finger, T Braun, K Hellmuth, & D Wolf (1996), "Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast." *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 15, 753–763.
- Lang, S, J Benedix, S Fedeles, S Schorr, C Schirra, N Schäuble, C Jalal, M Greiner, S Hassden-teufel, J Tatzelt, B Kreutzer, L Edelman, E Krause, J Rettig, S Somlo, R Zimmermann, & J Dudek (2012), "Different effects of Sec61 $\alpha$ , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells." *J. Cell Sci.*, 125, 1958–1969.
- Lecker, S, A Goldberg, & W Mitch (2006), "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 1807–1819.
- Lemmon, S (2001), "Clathrin uncoating: Auxilin comes to life." *Curr. Biol.*, 11, R49–52.
- Lilley, B & H Ploegh (2004), "A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER." *Nature*, 429, 834–840.
- Lipson, C, G Alalouf, M Bajorek, E Rabinovich, A Atir-Lande, M Glickman, & S Bar-Nun (2008), "A proteasomal ATPase contributes to dislocation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates." *J. Biol. Chem.*, 283, 7166–7175.
- Loayza, D, A Tam, W Schmidt, & S Michaelis (1998), "Ste6p Mutants Defective in Exit from the Endoplasmic Reticulum ( ER ) Reveal Aspects of an ER Quality Control Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell*, 9, 2767–2784.
- Lowry, O, N Rosebrough, L Farr, & R Randall (1951), "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *J. Bioenerg. Biomembr.*, 193, 265–275.

- Lyman, S K & R Schekman (1995), "Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Cell Biol.*, 131, 1163–1171.
- Mades, A, K Gotthardt, K Awe, J Stieler, T Döring, S Fuser, & R Prange (2012), "Role of human sec63 in modulating the steady-state levels of multi-spanning membrane proteins." *PLoS One*, 7, e49243.
- Mandel, H (1970), "Calcium-dependent Bacteriophage DNA." *J. Mol. Biol.*, 53, 159–162.
- Matlack, K, B Misselwitz, K Plath, & T Rapoport (1999), "BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane." *Cell*, 97, 553–564.
- Mayer, T, T Braun, & S Jentsch (1998), "Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein." *EMBO J.*, 17, 3251–3257.
- McCracken, A & J Brodsky (1996), "Assembly of ER-Associated Protein Degradation In Vitro : Dependence on Cytosol, Calnexin and ATP." *J. Cell Biol.*, 132, 291–298.
- Meusser, B, C Hirsch, E Jarosch, & T Sommer (2005), "ERAD: the long road to destruction." *Nat. Cell Biol.*, 7, 766–772.
- Meyer, H, H Grau, R Kraft, S Kostka, S Prehn, K Kalies, & E Hartmann (2000), "Mammalian Sec61 Is Associated with Sec62 and Sec63." *J. Biol. Chem.*, 275, 14550–14557.
- Miller, J (1972), "Beta-Galactosidase-Assay." In *Exp. Mol. Genet.*
- Monk, K, M Voas, C Franzini-Armstrong, I Hakkinen, & W Talbot (2013), "Mutation of sec63 in zebrafish causes defects in myelinated axons and liver pathology." *Dis. Model. Mech.*, 6, 135–145.
- Mori, K (2009), "Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals." *J. Biochem.*, 146, 743–750.
- Mori, K, W Ma, M Gething, & J Sambrook (1993), "A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus." *Cell*, 74, 743–756.
- Mori, K, N Ogawa, T Kawahara, H Yanagi, & T Yura (1998), "Palindrome with Spacer of One Nucleotide Is Characteristic of the cis-Acting Unfolded Protein Response Element in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.*, 273, 9912–9920.

- Mori, K, A Sant, K Kohnol, K Normington, M Gething, & J Sambrook (1992), "A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins." *EMBO J.*, 1, 2583–2593.
- Mukhopadhyay, D & H Riezman (2007), "Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling." *Science*, 315, 201–205.
- Müller, L, M Escarriaza, P Lajoie, M Theis, M Jung, A Müller, C Burgard, M Greiner, E Snapp, J Dudek, & R Zimmermann (2010), "Evolutionary Gain of Function for the ER Membrane Protein Sec62 from Yeast to Humans." *Mol. Biol. Cell*, 21, 691–703.
- Müller, L, Y Funato, H Miki, & R Zimmermann (2011), "An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease." *FEBS Lett.*, 585, 596–600.
- Müsch, A, M Wiedmann, & T Rapoport (1992), "Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane." *Cell*, 69, 343–352.
- Nakatsukasa, K, G Huyer, S Michaelis, & J Brodsky (2008), "Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein." *Cell*, 132, 101–112.
- Neuber, O, E Jarosch, C Volkwein, J Walter, & T Sommer (2005), "Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation." *Nat. Cell Biol.*, 7, 993–998.
- Ng, D, J Brown, & P Walter (1996), "Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane." *J. Cell Biol.*, 134, 269–278.
- Ng, D & P Walter (1996), "ER membrane protein complex required for nuclear fusion." *J. Cell Biol.*, 132, 499–509.
- Ng, W, T Sergeyenko, N Zeng, J Brown, & K Römisch (2007), "Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum." *J. Cell Sci.*, 120, 682–691.
- Nims, N, D Vassmer, & R Maser (2003), "Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains." *Biochemistry*, 1, 13035–13048.
- Nishikawa, S, J Brodsky, & K Nakatsukasa (2005), "Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD)." *J. Biochem.*, 137, 551–555.

- Nishikawa, S, S Fewell, Y Kato, J Brodsky, & T Endo (2001), "Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation." *J. Cell Biol.*, 153, 1061–1070.
- Oka, O & N Bulleid (2013), "Forming disulfides in the Endoplasmic Reticulum." *Biochim. Biophys. Acta*, 1833, 2425–2429.
- Osborne, A, T Rapoport, & B van den Berg (2005), "Protein translocation by the Sec61/SecY channel." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 529–550.
- Palade, G (1975), "Intracellular aspects of the Process of Protein Synthesis." *Science*, 189, 347–358.
- Panzner, S, L Dreier, E Hartmann, S Kostka, & T Rapoport (1995), "Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p." *Cell*, 81, 561–570.
- Peters, D & L Sandkuijl (1992), "Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe." *Contrib Nephrol.*, 97, 128–139.
- Pilon, M, K Römisch, D Quach, & R Schekman (1998), "Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane." *Mol. Biol. Cell*, 9, 3455–3473.
- Pilon, M, R Schekman, & K Römisch (1997), "Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation." *EMBO J.*, 16, 4540–4548.
- Plath, K, W Mothes, B Wilkinson, C Stirling, & T Rapoport (1998), "Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane." *Cell*, 94, 795–807.
- Plath, K, B Wilkinson, C Stirling, & T Rapoport (2004), "Interactions between Sec Complex and Prepro- Alpha -Factor during Posttranslational Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum." *Mol. Biol. Cell*, 15, 1–10.
- Plempner, R, S Böhmler, J Bordallo, T Sommer, & D Wolf (1997), "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." *Nature*, 388, 891–895.

- Plempner, R, J Bordallo, P Deak, C Taxis, R Hitt, & D Wolf (1999a), "Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation." *J. Cell Sci.*, 112, 4123–4134.
- Plempner, R, P Deak, R Otto, & D Wolf (1999b), "Re-entering the translocon from the luminal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated carboxypeptidase yscY species." *FEBS Lett.*, 443, 241–245.
- Ponting, C (2000), "Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction." *Biochem J.*, 535, 527–535.
- Pool, M (2005), "Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (Review)." *Mol. Membr. Biol.*, 22, 3–15.
- Qian, Q, A Li, B King, P Kamath, D Lager, J Huston, C Shub, S Davila, S Somlo, & V Torres (2003), "Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease." *Hepatology*, 37, 164–171.
- Qian, Y, D Patel, F Hartl, & D McColl (1996), "Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain." *J. Mol. Biol.*, 40, 224–235.
- Quan, E, Y Kamiya, D Kamiya, V Denic, J Weibezahn, K Kato, & J Weissman (2008), "Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation." *Mol. Cell*, 32, 870–877.
- Rape, M, T Hoppe, I Gorr, M Kalocay, H Richly, & S Jentsch (2001), "Mobilization of Processed, Membrane-Tethered SPT23 Transcription Factor by CDC48 UFD1/NPL4, a Ubiquitin-Selective Chaperone." *Cell*, 107, 667–677.
- Rapoport, T (2007), "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." *Nature*, 450, 663–669.
- Reithinger, J, Ji Kim, & H Kim (2013), "Sec62 protein mediates membrane insertion and orientation of moderately hydrophobic signal anchor proteins in the endoplasmic reticulum (ER)." *J. Biol. Chem.*, 288, 18058–18067.
- Römisch, K (1999), "Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane." *J. Cell Sci.*, 112, 4185–4191.
- Römisch, K (2005), "Endoplasmic reticulum-associated degradation." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 435–456.

- Ron, D & P Walter (2007), "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 519–529.
- Rothblatt, J, R Deshaies, S Sanders, G Daum, & R Schekman (1989), "Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast." *J. Cell Biol.*, 109, 2641–2652.
- Rubenstein, E, S Kreft, W Greenblatt, R Swanson, & M Hochstrasser (2012), "Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase." *J. Cell Biol.*, 197, 761–773.
- Ruddock, L & M Molinari (2006), "N-glycan processing in ER quality control." *J. Cell Sci.*, 119, 4373–4380.
- Sanders, S, K Whitfield, J Vogel, M Rose, & R Schekman (1992), "Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER." *Cell*, 69, 353–365.
- Sanger, F, S Nicklen, & R Coulson (1977), "DNA sequencing with chain-terminating." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 5463–5467.
- Sato, B, D Schulz, P Do, & R Hampton (2009), "Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase." *Mol. Cell*, 34, 2122–22.
- Schäfer, A & D Wolf (2009), "Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery." *EMBO J.*, 28, 2874–2884.
- Schiestl, R & R Gietz (1989), "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." *Curr. Genet.*, 16, 339–346.
- Schnell, D & D Hebert (2003), "Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes." *Cell*, 112, 491–505.
- Scidmore, M, H Okamura, & M Rose (1993), "Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum." *Mol. Biol. Cell*, 4, 1145–1159.
- Scott, D & R Schekman (2008), "Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins." *J. Cell Biol.*, 181, 1095–1105.

- Shamu, C & P Walter (1996), "Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus." *EMBO J.*, 15, 3028–3039.
- Sidrauski, C, J Cox, & P Walter (1996), "tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response." *Cell*, 87, 405–413.
- Siegel, V & P Walter (1988), "Functional dissection of the signal recognition particle." *Trends Biochem. Sci.*, 13, 314–316.
- Sikorski, R & P Hieter (1989), "A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in." *Genetics*, 122, 19–27.
- Silberstein, S, G Schlenstedt, P Silver, & R Gilmore (1998), "A role for the DnaJ homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum." *J. Cell Biol.*, 143, 921–933.
- Skowronek, M, M Rotter, & I Haas (1999), "Molecular Characterization of a Novel Mammalian DnaJ-Like Sec63p Homolog." *Biol Chem*, 380, 1133–1138.
- Sommer, T & S Jentsch (1993), "A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum." *Lett. to Nat.*, 365, 176–179.
- Sousa, R & E Lafer (2006), "Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor." *Traffic*, 7, 1596–1603.
- Spiller, M & C Stirling (2011), "Preferential targeting of a signal recognition particle-dependent precursor to the Ssh1p translocon in yeast." *J. Biol. Chem.*, 286, 21953–21960.
- Stolz, A & D Wolf (2010), "Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell." *Biochim. Biophys. Acta*, 1803, 694–705.
- Su, Y, C Hutter, J Trent, & P Meltzer (1996), "Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas." *Mol. Carcinog.*, 4, 270–275.
- Suh, K, J Bergmann, & C Gabel (1989), "Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins." *J. Cell Biol.*, 108, 811–819.
- Swanson, R, M Locher, & M Hochstrasser (2001), "A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation." *Genes Dev.*, 15, 2660–2674.

- Taxis, C, R Hitt, S Park, P Deak, Z Kostova, & D Wolf (2003), "Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD." *J. Biol. Chem.*, 278, 35903–35913.
- Taylor, S, P Thibault, D Tessier, J Bergeron, & D Thomas (2003), "Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase." *EMBO Rep.*, 4, 405–411.
- Tran, J, L Tomsic, & J Brodsky (2011), "A Cdc48p-associated factor modulates endoplasmic reticulum-associated degradation, cell stress, and ubiquitinated protein homeostasis." *J. Biol. Chem.*, 286, 5744–55.
- Travers, K, C Patil, L Wodicka, D Lockhart, J Weissman, & P Walter (2000), "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." *Cell*, 101, 249–258.
- Vashist, S, W Kim, W Belden, E Spear, C Barlowe, & D Ng (2001), "Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding." *J. Cell Biol.*, 155, 355–368.
- Vashist, S & D Ng (2004), "Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control." *J. Cell Biol.*, 165, 41–52.
- Vembar, S & J Brodsky (2008), "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 944–957.
- Vembar, S, M Jonikas, L Hendershot, J Weissman, & J Brodsky (2010), "J domain co-chaperone specificity defines the role of BiP during protein translocation." *J. Biol. Chem.*, 285, 22484–22494.
- Verma, R, S Chen, R Feldman, D Schieltz, J Yates, J Dohmen, & R Deshaies (2000), "Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes." *Mol. Biol. Cell*, 11, 3425–3439.
- Voges, D, P Zwickl, & W Baumeister (1999), "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 1015–1068.
- von Heijne, G (1985), "Signal sequences. The limits of variation." *J. Mol. Biol.*, 184, 99–105.

- Waanders, E, H Venselaar, R te Morsche, D de Koning, P Kamath, V Torres, S Somlo, & J Drenth (2010), "Secondary and tertiary structure modeling reveals effects of novel mutations in polycystic liver disease genes PRKCSH and SEC63." *Clin. Genet.*, 78, 47–56.
- Wahlman, J, G DeMartino, W Skach, N Bulleid, J Brodsky, & A Johnson (2007), "Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system." *Cell*, 129, 943–955.
- Walsh, P, D Bursać, Y Law, D Cyr, & T Lithgow (2004), "The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation." *EMBO Rep.*, 5, 567–571.
- Walter, P & D Ron (2011), "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." *Science*, 334, 1081–1086.
- Ward, C, S Omura, & R Kopito (1995), "Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway." *Cell*, 83, 121–127.
- Watnick, T, V Torres, M Gandolph, F Qian, L Onuchic, K Klinger, G Landes, & G Germino (1998), "Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease." *Mol. Cell*, 2, 247–251.
- Wiertz, E, D Tortorella, M Bogyo, & J Yu (1996), "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." *Nature*, 384, 432–438.
- Wilkinson, B, J Tyson, P Reid, & C Stirling (2000), "Distinct Domains within Yeast Sec61p Involved in Post-translational Translocation and Protein Dislocation." *J. Biol. Chem.*, 275, 521–529.
- Willer, M, A Jermy, B Young, & C Stirling (2003), "Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane." *Yeast*, 20, 133–148.
- Wittke, S, M Dünwald, M Albertsen, & N Johnsson (2002), "Recognition of a Subset of Signal Sequences by Ssh1p, a Sec61p-related Protein in the Membrane of Endoplasmic Reticulum of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell*, 13, 2223–2232.
- Wittke, S, M Dünwald, & N Johnsson (2000), "Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex." *Mol. Biol. Cell*, 11, 3859–3871.

- Xie, W & D Ng (2010), "ERAD substrate recognition in budding yeast." *Semin. cell Dev. Biol.*, 21, 533–539.
- Xu, X, K Kanbara, H Azakami, & A Kato (2004), "Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue." *J. Biochem.*, 618, 615–618.
- Ye, Y, H Meyer, & T Rapoport (2001), "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." *Nature*, 414, 652–656.
- Yoshida, H (2007), "ER stress and diseases." *FEBS J.*, 274, 630–658.
- Yoshida, H, T Matsui, A Yamamoto, T Okada, & K Mori (2001), "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell*, 107, 881–891.
- Young, B, R Craven, P Reid, M Willer, & C Stirling (2001), "Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo." *EMBO J.*, 20, 262–271.
- Zimmermann, R (2009), *Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum*.
- Zimmermann, R, S Eyrisch, M Ahmad, & V Helms (2011), "Protein translocation across the ER membrane." *Biochim. Biophys. Acta*, 1808, 912–924.

# Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Karin Römisch für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten und die zahlreichen hilfreichen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann danke ich, dass er sich als Zweitkorrektor zur Verfügung stellt und für die Möglichkeit die anfänglichen Experimente meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Seine stete Diskussionsbereitschaft und Hilfe waren mir eine große Unterstützung.

Weiterhin geht mein Dank an Prof. Dr. Jeremy Brown für die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe eine Vielzahl von gentechnischen Methoden zu erlernen, die meine Doktorarbeit stark voran gebracht haben.

Ich danke ebenfalls den Professoren Davis Ng, Randy Schekman und Colin Stirling für Hefestämme, Plasmide und Antikörper.

Der gesamten Arbeitsgruppe Römisch danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit. Im Besonderen habe ich in Marie-Luise Kaiser eine humorvolle und herzliche Freundin gefunden, die mir während dieser Zeit eine große Unterstützung war. Ebenfalls danke ich Marie-Christine Klein, Yamila Betz und Nina Tran für eine schöne Zeit und die freundschaftliche Arbeits-Atmosphäre. Mein Dank geht außerdem an Carmen Clemens, Birgit Hasper, Juncal Gonzalez und Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring für ihre Hilfe im Labor, die moralische Unterstützung und viele schöne Gespräche.

Der AG Zimmermann und AG Schmitt danke ich für viele produktive Diskussionen und die ständige Hilfsbereitschaft zu Problemlösungsstrategien beizutragen.

Ich danke meiner Familie, dass sie mich immer in meinen Vorhaben bestärkt haben.

Matthias Scholtes danke ich für die sehr nützlichen Tipps im Umgang mit diversen Computerprogrammen, ohne die diese Arbeit nicht so schön formatiert wäre, seine Geduld und für seine liebevolle Unterstützung.