

Die Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation (ERAD) eines fehlgefalteten Membran verankerten Proteins mit variierender zytoplasmatischer Domäne und die Entdeckung eines neuen ERAD-Weges

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von Dipl.-Biol. Stefanie Besser
geboren in Bad Urach

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Mitberichter: Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Hilt
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Peter Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2012

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbst verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, den 03.08.2011

Stefanie Besser

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	2
Abkürzungen	6
Genetische Nomenklatur	7
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
1. Zusammenfassung	10
2. Summary	13
3. Einleitung	16
3.1 Das sekretorische System und die Proteinqualitätskontrolle im ER	16
3.2 Proteinimport ins Endoplasmatische Retikulum	17
3.3 Die Erkennung von fehlgefalteten Proteinen im ER	17
3.4 Die Retrotranslokation von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER ins Zytosol	20
3.4.1 Der Importkanal Sec61	20
3.5 Die AAA-ATPase Cdc48 und ihre Kofaktoren	21
3.5.1 Cdc48	22
3.5.2 Substrat-rekrutierende Kofaktoren	22
3.5.2.1 Der Ufd1-Npl4-Komplex	23
3.5.2.2 Die Ubx-Protein-Familie	23
3.5.3 Substrat-prozessierende Kofaktoren	23
3.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System	23
3.6.1 Ubiquitin und die E1-E2-E3-Kaskade	24
2.6.2 Das Proteasom	25
3.7 Varianten der ER-assoziierten Degradation	26
3.8 Die Ubiquitin-Ligase Ubr1 und der <i>N-end rule</i> -Abbauweg	29
3.9 Aufgabenstellung	29
4. Material und Methoden	31
4.1 Material und Geräte	31
4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	31
4.1.2 Geräte	33
4.1.3 Antikörper	34
4.1.3.1 Primäre Antikörper	34
4.1.3.2 Sekundäre Antikörper	34
4.1.4 Organismen	34
4.1.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	34
4.1.4.2 <i>Escherichia coli</i> Stämme	36
4.1.5 Plasmide	37
4.1.6 Synthetische Oligonukleotide	38
4.1.7 Computeranalysen	41
4.2 Zellbiologische Methoden	42
4.2.1 Zellkultivierung	42
4.2.1.1 Medien	42
4.2.2 Wachstumsbedingungen für die Hefe <i>S. cerevisiae</i>	43
4.2.3 Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i>	43
4.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung zur Lebend-Tot-Diskriminierung von <i>S. cerevisiae</i> Zellen	44
4.3 Molekularbiologische Methoden	44
4.3.1 Konstruktion von Hefestämmen	44
4.3.1.1. Sporulation und Tetradendissektion	46
4.3.2 Konstruktion von Plasmiden	47
4.3.3 Isolierung chromosomaler DNA	48

4.3.4 Southernblot Analyse	48
4.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen („plasmid rescue“)	48
4.3.6 Zelltransformationen	49
4.3.6.1 Transformation von Plasmid-DNA in <i>S. cerevisiae</i>	49
4.3.6.2 Transformation von Deletions- oder Integrationskassetten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
4.3.6.3 Elektrotransformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen	49
4.3.6.4 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Hitzeschock	50
4.3.7 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	50
4.3.7.1 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen für Elektroporation	50
4.3.7.2 Herstellung von kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen für Hitzeschock-Transformation	50
4.3.8 Polymerasekettenreaktion	50
4.3.8.1 Standard Kontroll-PCR	51
4.3.8.2 Phusion®-PCR	51
4.3.8.3 Kolonie-PCR	51
4.3.9 Agarose-Gelelektrophorese	51
4.3.10 Restriktionsverdau	52
4.3.11 Ligation	52
4.3.12 DNA-Sequenzierung	52
4.3.13 Easy Plasmid Miniprep	52
4.4 Proteinbiochemische Methoden	53
4.4.1 Alkalische Lyse	53
4.4.2 Gesamtproteinextraktion	53
4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
4.4.4 Western Blot	54
4.4.5 PonceauS-Färbung	54
4.4.6 Immunologische Detektion	54
4.4.7 Cycloheximid Chase Analyse	55
4.4.8 Pulse Chase Experiment	55
4.4.9 Membranextraktionsexperiment	56
4.4.10 Sphäroblastieren von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen	56
4.4.11 Proteinase K-Experiment	57
4.4.12 Detektion polyubiquitinerter Membranproteine	57
5 Ergebnisse	59
5.1 Charakterisierung der ERAD-Substrate	59
5.1.1 Die ERAD-L Substrate CTG*, CTL*myc und CTD*	59
5.1.2 Mutierte Carboxypeptidase Y (CPY*) als Degradationsmotiv	60
5.1.2.1 Lokalisierung der akkumulierten Fragmente von TMD-GFP und GFP	62
5.1.3 Methotrexat	63
5.2 ER-Qualitätskontrolle und assoziierte Degradation (ERQD)	65
5.2.1 Kar2 ist am Abbau von Membranproteinen beteiligt	65
5.2.2 Das Chaperon Rot1 ist nicht an der ERAD beteiligt	67
5.2.3 Der1 ist am Abbau von integralen Membranproteinen beteiligt	68
5.2.4 Die E3-Ligase Doa10 ist nicht am Abbau von CTG* beteiligt	71
5.2.5 Das zytosolische Hsp70 Chaperon Ssa1 in ERAD	72
5.2.6 Indirekter Einfluß des Hsp40 Co-Chaperons Ydj1 auf den Abbau von CTD*	75
5.2.7 Hsp104-abhängiger Abbau von ERAD-L-Substraten mit zytosolisch stark gefalteten Domänen	76
5.2.8 Die Degradation von CTD* ist Cdc48-abhängig	77

5.2.8.1 Der Abbau von CTD* mit MTX ist vollständig abhängig von der AAA-ATPase Cdc48	77
5.2.8.2 Cdc48 agiert als potenzielle <i>Unfoldase</i> und <i>Segregase</i>	78
5.2.9 Beteiligung einiger <i>substrate-processing cofactors</i> von Cdc48 am Abbau der ERAD-L Substrate	79
5.2.9.1 Partieller Abbau der ERAD-L-Substrate in einer <i>ufd2</i> -Deletionsmutante	79
5.2.9.2 Otu1 beeinflusst das Degradationsverhalten der membrangebundenen ERAD-L-Substrate nicht	81
5.2.10 Beteiligung des E4-Enzyms Hul5 am Abbau von CTD*	81
5.2.10.1 CTD*myc +MTX wird in einer <i>hul5</i> -Deletionsmutante partiell abgebaut	82
5.2.10.2 Die katalytische Aktivität des E4-Enzyms Hul5 ist für den Abbau des ERAD-L-Substrats CTD*myc +MTX erforderlich	83
5.3 Ein neuer Ubr1-abhängiger ERAD-Weg	85
5.3.1 ERAD ohne ER-Ubiquitin-Ligasen erfordert die Beteiligung von Ubr1	85
5.3.2 Ubr1 wird nicht an die ER-Membran rekrutiert	87
5.3.3 Die ERAD-L-Substrate bleiben bei inhibiertem Proteasom in der ER-Membran verankert	89
5.3.4 Polyubiquitinierung des ERAD-L-Substrats CTG*	90
5.3.4.1 CTG* wird bei Abwesenheit der bekannten E3 Ligasen weiterhin Polyubiquitiniert	90
5.3.4.2 CTG* wird an der zytosolisch lokalisierten Domäne polyubiquitiniert	91
5.3.5 CTG* wird im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg proteasomal abgebaut	94
5.3.6 Der1 und Dfm1 beeinflussen den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg nicht	95
5.3.7 Sec61 ist möglicherweise am Ubr1-abhängigen ERAD-Weg beteiligt	96
5.3.8 Cdc48 wird nicht im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg von CTG* benötigt	98
5.3.9 Ubx2 ist eventuell nicht in den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg involviert	98
5.3.10 Das Hsp40-Co-Chaperon Hlj1 hat einen direkten Einfluss im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg	99
5.3.11 E2-Proteine, die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme	100
5.3.11.1 Das Ubiquitin-konjugierende E2-Enzym Ubc2	101
5.3.11.2 Die Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme Ubc6 und Ubc7	102
5.3.11.3 Polyubiquitinierung von CTG*	103
6 Diskussion	105
7 Literaturverzeichnis	118
Danksagung	134
Curriculum Vitae	135

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius	min	Minuten
AAA	<i>ATPase associated with a variety of cellular activities</i>	µl	Mikroliter
Amp	Ampicillin	ml	Mililiter
APS	Ammoniumpersulfat	MTX	Methotrexat
ATP	Adenosintriphosphat	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ= 600 nm
ATPase	Adenosintriphosphatase	ORF	<i>open reading frame</i>
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamid-Gel-elektrophorese
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
CPY	Carboxypeptidase ysc Y	PCR	Polymerasekettenreaktion
CPY*	Carboxypeptidase Y ^{G255R}	PEG	Polyethylenglykol
CT*	CPY*-Transmembrandomäne	PGK	3-Phosphoglyceratkinase
CTG*	CPY*-Transmembrandomäne-GFP	PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
CTL*	CPY*-Transmembrandomäne-3-Isopropylmalat-Dehydrogenase	PQC	<i>protein quality control</i>
Da	Dalton	RING	<i>really interesting new gene</i>
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser	RNase	Ribonuklease S Serin
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase	SC	<i>synthetic complete S. cerevisiae Saccharomyces Cerevisiae</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonucleinsäure	SEM	<i>standard error of the mean</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (N = Adenosin, Cytidin, Guanodin, Thymidin)	TAE	Tris-Acetat mit EDTA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>	TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TCA	Trichloressigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum	TE	Tris mit EDTA
ERAD	ER-assoziierte Degradation	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
ERQC	ER Qualitätskontrolle	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
ERQD	ER Qualitätskontrolle und assoziierte Degradation	Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)	ts	temperatursensitiv
EtOH	Ethanol	Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
g	Erdbeschleunigung	U	Units
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	UBA	<i>ubiquitin-associated domain</i>
Glc	Glukose	UBL	<i>ubiquitin-like domain</i>
h	Stunde	UBX	<i>ubiquitin regulatory X</i>
HA	Haemagglutinin	UPR	<i>unfoldase protein response</i>
HECT	homologous to E6-AP C terminus	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	UV	Ultraviolett
Hsp	<i>heat shock protein</i>	v/v	Volumen pro Volumen
IP	Immunopräzipitation	w/v	Gewicht pro Volumen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
Kb	Kilobasenpaare	XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
kDa	Kilodalton	YPD	<i>yeast peptone dextrose</i>
LB	Luria-Bertani-Medium	β-ME	2-Mercaptoethanol
Leu2	3-Isopropylmalat-Dehydrogenase	Δss	Deletion der Signalsequenz
MDa	Megadalton		
MCS	<i>multiple cloning site</i>		

Tabelle I soll einen Überblick über die in dieser Arbeit angewendete Nomenklatur für die chromosomalen Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* geben. Die angegebene genetische Nomenklatur wurde aus *Getting Started with Yeast by Fred Sherman* (<http://www.urmc.rochester.edu/labs/Sherman-Lab/publications/pdfs/Getting-Started-With-Yeast.pdf>; *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002)) übernommen. Um die angewendete genetische Nomenklatur zu illustrieren, wurde *SSA1* als Beispiel verwendet.

Gensymbol	Definition
<i>SSA1</i>	wildtypisches Allel
<i>ssa1</i>	rezessives und defektes Allel
<i>ssa1-45</i>	punktmutiertes Allel
<i>ssa1ΔLEU2</i>	Komplette Deletion des <i>SSA1</i> -Gens und Insertion des funktionalen <i>LEU2</i> -Gens
<i>ssa1::LEU2</i>	Insertion des funktionalen <i>LEU2</i> -Gens am <i>SSA1</i> -Lokus, <i>ssa1</i> wird nicht-funktional
<i>ssa1::ΔLEU2</i>	Partielle Deletion des <i>SSA1</i> -Gens und Insertion des funktionalen <i>LEU2</i> -Gens
Ssa1	Protein, das durch <i>SSA1</i> codiert wird

Tabelle I: Genetische Nomenklatur, die in der vorgelegten Arbeit angewendet wurde.

Tabelle I:	Genetische Nomenklatur, die in der vorgelegten Arbeit angewendet wurde	7
Abbildung 3.1:	Die Prozessierung der Glykoproteine während der ERQC in <i>S. cerevisiae</i>	20
Abbildung 3.2:	Das Ubiquitin-Proteasom-System	25
Abbildung 3.3:	Modell der ER-assoziierten Degradation mit den beteiligten Komponenten	27
Tabelle 4.1:	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 4.2:	In dieser Arbeit verwendete Geräte	33
Tabelle 4.3:	In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper	34
Tabelle 4.4:	In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper	34
Tabelle 4.5:	In dieser Arbeit verwendeten Hefestämme	34
Tabelle 4.6:	In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	36
Tabelle 4.7:	In dieser Arbeit verwendete Plasmide	37
Tabelle 4.8:	In dieser Arbeit verwendete Primer	38
Tabelle 4.9:	Verwendete Medien für Hefekulturen	42
Tabelle 4.10:	Verwendete Medien für Bakterienkulturen	43
Tabelle 4.11:	Komponenten der Gele für die SDS-PAGE	54
Abbildung 5.1:	Schematische Darstellung der ERAD-Substrate CTG*, CTL*myc und CTD* ohne und mit MTX	60
Abbildung 5.2:	Die Substrate CPY* und CTG* enthalten beide das gleiche Degradationsmotiv im Lumen des ER	61
Abbildung 5.3:	Die akkumulierten Fragmente von CTG, TMD-GFP und GFP werden in die Vakuolenmembran eingelagert	63
Abbildung 5.4:	Methotrexat (MTX) beeinträchtigt die Zellvitalität nicht	64
Abbildung 5.5:	Kar2, das lumenale Hsp70-Chaperon, ist auch für den Abbau von einigen membrangebundenen Proteinen erforderlich	66
Abbildung 5.6:	Rot1 ist kein generelles Chaperon des ERAD-L-Weges	68
Abbildung 5.7:	Der1p ist für den Abbau von membrangebundenen Substraten mit lumenalem CPY*-Anteil notwendig	70
Abbildung 5.8:	Die ER membrangebundene E3-Ligase Doa10 ist nicht in den Abbau von CTG* involviert	72
Abbildung 5.9:	Der Abbau der Transmembransubstrate in Abhängigkeit von dem zytosolischen Hsp70-Chaperon Ssa1	74
Abbildung 5.10:	Der Abbau des ERAD-L-Substrats CTD* erfolgt in den temperatursensitiven <i>ydj1-151</i> Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beschleunigt	75
Abbildung 5.11:	Das zytosolische Hsp100 Chaperon Hsp104 ist am Abbau des ERAD-Substrats CTD* mit MTX beteiligt	76
Abbildung 5.12:	Die AAA-ATPase Cdc48 ist für den Abbau von CTD* mit MTX Essentiell	77
Abbildung 5.13:	Die AAA-ATPase Cdc48 agiert als potenzielle <i>unfoldase</i>	78
Abbildung 5.14:	Die E4-Ligase Ufd2 initiiert den vollständigen Abbau der ERAD-L-Substrate	80
Abbildung 5.15:	Das deubiquitinierende Enzym Otu1 hat keinen Einfluß auf den Abbau aller drei ERAD-L-Substrate	81
Abbildung 5.16:	Der Abbau des ERAD-Substrats CTD*myc mit MTX erfolgt über ein definiertes Zwischenprodukt	83

Abbildung 5.17:	Für die vollständige Degradation von CTD* +MTX ist die katalytische Aktivität von Hul5 notwendig	84
Abbildung 5.18:	Komplette Stabilisierung der membrangebundenen ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc bei fehlenden Ubiquitin-ER-Ligasen Der3/Hrd1, Doa10 und Ubr1	86
Abbildung 5.19:	Das Fehlen der zytosolischen Ubiquitin-Ligase Ubr1 in <i>der3/hrd1Δ doa10Δ-S. cerevisiae</i> -Zellen hat keinen zusätzlichen Einfluß auf das Degradationsverhalten von löslichem CPY*3HA und membrangebundenen CT*	87
Abbildung 5.20:	Flag-Ubr1 wird nicht an die ER-Membran rekrutiert	88
Abbildung 5.21:	Die ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc verbleiben bei inhibiertem Proteasom in der ER-Membran	89
Abbildung 5.22:	Ubiquitinierung von CTG* im Wildtypstamm sowie in den E3-Ligasen-Mehrfachmutanten	91
Abbildung 5.23:	Polyubiquitinierung der ERAD-Substrate CTG* und CTL*myc	93
Abbildung 5.24:	Bei Inhibierung des Proteasoms erfolgte eine Stabilisierung des Fusionsproteins CTG*	94
Abbildung 5.25:	Der1 und Dfm1 sind nicht in den Ubr1-abhängigen Abbauweg der getesteten Substrate CTG* und CTL*myc involviert	96
Abbildung 5.26:	Sec61 wirkt eventuell im neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg mit	97
Abbildung 5.27:	Cdc48 ist am neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg von CTG* nicht beteiligt	98
Abbildung 5.28:	Ubx2 ist möglicherweise nicht in den neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg Involviert	99
Abbildung 5.29:	Hlj1 ist am neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg beteiligt	100
Abbildung 5.30:	Ubc2 ist nicht das konjugierende E2 im Ubr1-abhängigen „Back up“-Weg	102
Abbildung 5.31:	Die konjugierenden E2`s Ubc6 und Ubc7 sind nicht in den neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg involviert	102
Abbildung 5.32:	Polyubiquitinierung des Membranproteins CTG* in den E2-Mehrfachmutanten	103

1 Zusammenfassung

Die Funktionalität neu synthetisierter Proteine ist unter anderem durch ihre korrekte dreidimensionale Faltung gegeben. Der Abbau von nicht funktionellen oder fehlgefalteten Proteinen schützt die Zelle vor Proteotoxizität, die zu schweren Beeinträchtigungen der Zellfunktion sowie Alzheimer-, Parkinson- und Creutzfeld-Jakob-Krankheit führt. Die Genauigkeit des Proteinreifungsprozesses ist so grundlegend wichtig, dass sich mehrere zelluläre Mechanismen entwickelt haben, die die Proteinfaltung überwachen. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) spielt eine entscheidende Rolle bei der Proteinqualitätskontrolle (PQC; engl. *protein quality control*) und der Reifung sekretorischer Proteine. Es stellt ein membranumschlossenes Kompartiment dar, welches für die Faltung, den oligomeren Aufbau und dem Transport von Proteinen optimiert ist, die bestimmt sind, im sekretorischen Weg zu agieren. Der Austritt aus dem ER ist durch ein strenges Qualitätssystem geregelt, das fehlgefaltete Polypeptide und unvollendet zusammengebaute Untereinheiten erkennt und zurückhält. Unvollständig gefaltete oder fehlgefaltete Proteine werden dem ER-assoziierten Abbauweg (ERAD; engl. *ER-associated degradation*) zugeführt. Die Retrotranslokation der fehlgefalteten Proteine über die ER-Membran ins Zytosol und der Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist für den ERAD-Prozess erforderlich. Die ER-Qualitätskontrolle (ERQC; engl. *ER-quality control*) und die ERAD sind eng miteinander verbunden und wird auch ER-Qualitätskontrolle und -assoziierte Degradation (ERQD; engl. *ER-quality control and degradation*) genannt. Diese Systeme sind evolutionär hoch konserviert und wurden in allen eukaryotischen Zellen von der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, einem einzelligen Pilz, bis hin zum Menschen gefunden. *S. cerevisiae* ist ein beliebter Modellorganismus aufgrund seiner einfachen Zugänglichkeit für proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden.

In dieser Arbeit wurde der Abbau von drei unterschiedlichen Substraten verglichen. Sie werden alle durch die ERQC erkannt und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Um zu untersuchen, ob die Faltungsintensität der zytosolischen Domäne für die substratspezifischen Anforderungen einiger ERAD-Komponenten verantwortlich ist, wurde eine Auswahl an fehlgefalteten Fusionsproteinen hergestellt, die die mutierte Carboxypeptidase Y (CPY*) im ER-Lumen als Degradationsmotiv tragen. Die verschiedenartigen zytosolischen Domänen wurden an den C-Terminus von CPY* über die letzte Transmembrandomäne des ABC-Transporterproteins Pdr5 fusioniert. Die Kollektion der fehlgefalteten Proteine mit unterschiedlicher zytosolischer Topologie besteht aus CTG*, CTL*myc und CTD*. CTG* besteht aus dem stark gefalteten grün fluoreszierenden Protein (GFP), welches über eine einzelne Transmembrandomäne an

CPY* fusioniert ist. Im Fall von CTL*myc ist dagegen die 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2) zytosolisch lokalisiert, welche zusätzlich mit einem myc-Epitop markiert ist, über eine Transmembrandomäne mit CPY* verbunden. Als ein Kontrollsubstrat trägt CTD* die Dehydrofolat-Reduktase (DHFR) im Zytosol. DHFR kann in eine zweite topologisch distinkte Form überführt werden, wenn Methotrexat (MTX) als Inhibitor hinzugefügt wird. Es entsteht ein stark gefalteter DHFR-MTX-Komplex. Dieser Vorteil sollte ausgenutzt werden, um den Einfluss zytosolisch unterschiedlich stark gefalteter Domänen auf die für den ER-Abbau notwendigen Komponenten zu studieren.

Es wurde bereits veröffentlicht, dass der Abbau von CTG* von der Ssa-Chaperonaktivität der Hsp70-Familie abhängig ist (Taxis *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass lösliches CPY* und membrangebundenes CT*, dem eine zytosolische Domäne ganz fehlt, dagegen unabhängig von der Aktivität der Hsp70-Chaperone abgebaut werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hsp70-Familie nicht in die Eliminierung von CTL*myc involviert ist. Bemerkenswerterweise ist die Chaperonaktivität der Ssa-Familie für den Abbau von CTD* essentiell, unabhängig von der Methotrexat Zugabe. Alle in dieser Arbeit getesteten Membranproteine mit stabilen zytosolischen Domänen (CTG* und CTD* +MTX) benötigten die Aktivität des Proteins Hsp104 für einen vollständigen Abbau.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das zytosolisch stark gefaltete CTD* +MTX in temperatursensitiven *cdc48 S. cerevisiae* Zellen unter restriktiven Bedingungen vollständig stabilisiert wird. Dagegen ist der Abbau von CTD* ohne MTX bloß deutlich verlangsamt. Diese Unterschiede im Abbauverhalten können nur aufgrund der unterschiedlichen Faltungstärken der zytosolischen Domänen der Substrate zustande kommen. CTD* +MTX verbleibt in temperatursensitiven *S. cerevisiae* Zellen unter restriktiven Bedingungen auch nach zwei Stunden komplett in der Membran liegen. Im Vergleich dazu wird CTD* ohne MTX von der ER-Membran entfernt und abgebaut.

Hul5 ist als E4-Ligase bekannt, die an der Verlängerung der Ubiquitinketten beteiligt ist (Crosas *et al.*, 2006). Die Hul5-Aktivität ist für den Abbau von CTG* überflüssig, während CTL*myc beginnend vom N-Terminus schrittweise in einem *HUL5* deletiertem *S. cerevisiae* Stamm abgebaut wird (Kohlmann *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CTD*myc ohne MTX in einer *hul5Δ* Mutante wie in einem Wildtyp *S. cerevisiae* Stamm abgebaut wird. Im Gegensatz dazu akkumulieren verkürzte Formen von CTD*myc +MTX, sogenannte truncCTD* +MTX Fragmente, in einer *hul5Δ* Mutante. Der vollständige Abbau von CTD*myc +MTX ist aufgrund der fehlenden Kettenverlängerung von Hul5 unterbrochen.

In *kar2*-Mutanten wird CTG* nicht in einem gleichen Ausmaß wie CTL*myc oder CTD* stabilisiert. Es ist jedoch deutlich von Kar2 abhängig. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die getesteten Substrate ein ähnliches Abbauverhalten in einer *der1*-Mutante aufweisen.

Die durchgeführten Versuche mit Fusionsproteinen mit zytosolisch unterschiedlichen Topologien zeigten, dass Chaperone und andere Faktoren für die Entfaltung der zytosolisch stark gefalteten Domänen vor dem proteasomalen Abbau unerlässlich sind.

Frühere Arbeiten zur ERAD ließen erkennen, dass die Deletion einer oder beider bekannter ER-Membran lokalisierter E3-Ligasen, Hrd1/Der3 und Doa10, nicht die vollständige Stabilisierung der untersuchten Substrate bewirkt (Gnann *et al.*, 2004; Huyer *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mindestens eine weitere E3-Ligase involviert sein muss, die den endgültigen Abbau einleitet. Ubr1 ist als E3-Ligase im *N-end rule* Weg (engl.) bekannt (Bartel *et al.*, 1990; Varshavsky, 1996a) und ist Teil der Abbaumaschinerie fehlgefalteter zytosolischer Substrate (Eisele *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2010). Der Abbau von CTG* und CTL*myc wurde deshalb in einer *der3/hrd1 doa10 ubr1*-Tripelmutante untersucht. Beide Substrate stabilisieren in einer Mutante, der alle drei genannten E3-Ligasen fehlen, vollständig. Vermutlich handelt es sich dabei um einen neuen Abbauweg, der für die finale Eliminierung der fehlgefalteten Substrate verantwortlich ist. Das Fehlen von Ubr1 zeigt in Anwesenheit der ER-Ligasen Hrd1/Der3 und Doa10 keinen Effekt im Abbau von CTG* und CTL*myc. Offenbar handelt es sich hier um einen „Rettungsweg“, der eingeschlagen wird, wenn die bekannten ER-Membran lokalisierten Ubiquitinligasen fehlen.

Wie erwartet, werden die Substrate CTG* und CTL*myc in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppelmutante weiterhin polyubiquitiniert. Die Isolierung von Vesikeln und nachfolgende Behandlung mit Proteinase K führt zu einem Verlust eines großen Anteils der Polyubiquitinierung. Dies lässt auf eine Ubiquitinierung an der zytosolischen Domäne des Substrats schließen. Um herauszufinden, welche weiteren Komponenten in den neuen Ubr1-abhängigen Weg involviert sind, wurden bekannte Komponenten aus dem ERAD-Weg zusätzlich in einem *der3/hrd1Δ doa10Δ S. cerevisiae* Hintergrund deletiert. CTG* wird in diesem Stammhintergrund weiterhin Proteasom abhängig abgebaut. Es konnte keine Beteiligung von Der1 und Dfm1 beobachtet werden. Erstaunlicherweise ist die AAA-ATPase Cdc48 in diesem Abbauweg entbehrlich. Das Hsp40 Co-Chaperon Hlj1 zeigte einen stabilisierenden Effekt im Ubr1-abhängigen Abbau von CTG*. Die Ubr1-abhängige Degradation des ERAD-L-Substrats CTG* wurde durch die fehlenden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc2, Ubc6 und Ubc7 nicht beeinflusst.

2 Summary

The functionality of newly synthesized proteins is acquired through folding into their correct three-dimensional structures. The degradation of non-functional or misfolded proteins protects the cell from proteotoxicity causing serious impairment of cell function and leading to Alzheimer-, Parkinson- and Creutzfeld-Jakob-disease in humans. The fidelity of the protein's maturation process is so important that several cellular mechanisms have evolved to monitor protein folding. The endoplasmic reticulum (ER) plays an essential role in protein quality control (PQC) and the maturation of secretory proteins. It provides a membrane enclosed compartment optimized for folding and oligomeric assembly of proteins destined to operate in the secretory system. Exit from the ER is regulated by a strict quality control system that recognizes and retains misfolded polypeptides and orphan protein subunits. Incompletely folded or misfolded proteins are subjected to ER-associated degradation (ERAD) pathways. ERAD requires retrotranslocation of the misfolded proteins across the ER membrane into the cytosol and degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS). The ER-quality control (ERQC) and the ERAD process are closely related and termed ER quality control and associated degradation (ERQD). These systems are evolutionarily highly conserved and found in all eukaryotic cells from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* to human. *S. cerevisiae* is a favoured model organism to unravel cellular processes due to its easy amenability to protein biochemistry and molecular biological methods.

In this study degradation of three different ERAD substrates were compared. All three substrates are recognized by the ERQC and targeted to proteasomal degradation. To investigate whether the differences in the tightness of folding is responsible for substrate-specific requirements of ERAD components, a set of three misfolded fusion proteins based on mutated Carboxypeptidase Y (CPY*) in the ER lumen as degradation motif was constructed. The three diverse cytosolic domains were fused to the C-terminus of CPY* via the last transmembrane domain of ABC transporter protein Pdr5. In this way three different membrane substrates with identical misfolded ER luminal domain and transmembrane domain but different cytosolic domains were engineered. The three substrates consist of CTG*, CTL*myc and CTD*. CTG* is built up of the tightly folded green fluorescent protein (GFP) in the cytosol fused to ER-luminal CPY* via a single transmembrane domain. CTL*myc is established by the cytosolic 3-isopropylmalate dehydrogenase (Leu2) tagged with a myc epitope and linked to ER luminal CPY* via the single C-terminal transmembrane domain of Pdr5. CTD* is similarly constructed as CTG* and CTL*myc carrying the dehydrofolate reductase (DHFR) in the cytosol. DHFR can be forced into two topologically distinct forms with and without the inhibitor Methotrexate (MTX). These different cytosolic domains fused to an otherwise identical ERAD substrate

should be used to study the influence of cytosolic domains on the requirement of components necessary for ERAD.

It was published that degradation of CTG* is strongly dependent on the Ssa family of Hsp70 chaperones (Taxis *et al.*, 2003). In contrast soluble CPY* and membrane bound CT* lacking a cytosolic domain were degraded independently of the activity of Hsp70 chaperones. Moreover *in vitro* data showed that the 26S proteasome alone is unable to degrade the tightly folded GFP domain (Liu *et al.*, 2003). These findings indicate that stabilization of CTG* occurs due to the solid cytosolic domain and suggest that additional factors are required for efficient unfolding prior to proteasomal degradation. In fact the Ssa Hsp70 family is not involved in CTL*myc breakdown. Remarkably however, the chaperone activity of the Ssa family is again essential for CTD* degradation independently of MTX addition. Obviously, the cytosolic domain of CTD* exposes specific structural characteristics which require Ssa1 not only for the tight conformation induced by MTX. Hsp100 chaperones are known to act in protein unfolding (Glover and Lindquist, 1998; Weber-Ban *et al.*, 1999). All checked membrane proteins with stable cytosolic domains (CTG* and CTD* +MTX) were shown to require the activity of Hsp104 for proper degradation.

It was previously shown that the action of the Cdc48-Ufd1-Npl4 AAA-ATPase complex in ERAD is necessary for degradation of soluble and membrane proteins of the ER being independent of substrate topology (Bays *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001; Jarosch *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Taxis *et al.*, 2003). However degradation of CTD* without MTX was only delayed in temperature-sensitive *cdc48^{ts}* *S. cerevisiae* cells while the cytosolic, strong folded CTD* +MTX was stabilized completely. These differences in turnover could only occur because of different topologies of the cytosolic domains of substrates. CTD* with MTX remained completely in the membrane after 2 hours whereas CTD* without MTX is removed from the ER membrane and then degraded. Cdc48 may function as *unfoldase*, by this potentially unfolding the cytosolic complex domains prior to extraction from the ER membrane.

Hul5 is known to function as an E4 ligase involved in ubiquitin chain elongation (Crosas *et al.*, 2006). It was shown, that activity of Hul5 is not required for CTG* degradation (Kohlmann *et al.*, 2008). In contrast CTL*myc is degraded in a stepwise manner starting at the N-terminus in a *HUL5* deletion strain. CTD*myc without MTX degraded in a *hul5Δ* mutant like in wild type *S. cerevisiae* cells. Truncated forms of CTD*myc +MTX, truncCTD*myc +MTX, accumulate in a *HUL5* deletion strain. The degradation of CTD*myc +MTX is halted due to the missing chain-elongating activity of Hul5. CTD*myc displays obviously a similar loop-out-mechanism during degradation as CTL*myc (Kohlmann *et al.*, 2008).

In this work it was shown that in *KAR2* mutations CTG* is not stabilized to the extent of CTL*myc or CTD*, but is clearly dependent of Kar2. Thus Kar2 is most likely required for the recognition of the unfolded state of the luminal CPY* moiety and functions as chaperone to keep the substrate in a competent state for dislocation. The substrates behave almost in the same manner in *DER1* deleted *S. cerevisiae* cells. Kar2 and Der1 are not only important for degradation of soluble substrates, they are also required for a selection of transmembrane bound proteins with an ER-luminal misfolded domain.

The studies on the cytosolic topology variants of fusion proteins showed that chaperones and other factors are indispensable to unfold cytosolic tightly folded parts of the molecule before degradation. Nevertheless, cells discriminate to a lesser extent between weakly and strongly folded cytosolic domains. The components necessary for degradation are recruited depending on the structural characteristics of cytosolic domains.

Former studies on ERAD revealed that deletion of one or both of the two known ER membrane localized E3 ligases in some cases did not induce complete stabilization of the substrate tested (Gnann *et al.*, 2004; Huyer *et al.*, 2004). These findings argue for the involvement of at least one further E3 ligase that promotes the ultimate degradation. Ubr1 is known to act as an E3 ligase in the N-end rule pathway (Bartel *et al.*, 1990; Varshavsky, 1996a) and – most interestingly – in the degradation of misfolded cytosolic proteins (Eisele *et al.*, 2008; Heck *et al.*, 2010). Therefore degradation of the substrates CTG* and CTL*myc was analysed in a *der3/hrd1 doa10 ubr1*-triple deletion mutant. Both substrates were stabilized completely in this mutant. As deletion of Ubr1 alone shows no effect on degradation of CTG* and CTL*myc, the novel pathway possibly represents a back up mechanism once the canonical ER ligases are missing.

Substrates were still polyubiquitylated in a *der3/hrd1 doa10*-double mutant. Treatment of isolated ER vesicles with proteinase K led to disappearance of a great part of the polyubiquitylated material. To study the components involved in the novel Ubr1-dependent ERAD pathway, known components from this pathway were deleted in addition in *S. cerevisiae* strains with a *der3/hrd1Δ doa10Δ*-background. Degradation of CTG* was still dependent on the proteasome. There was no requirement of Der1 and Dfm1 observed. The involvement of the AAA-ATPase Cdc48 was dispensable for the Ubr1 dependent degradation of CTG*. Hlj1 showed an stabilized effect in degradation of CTG*. It was not possible to identify the specified ubiquitin-conjugating enzyme E2 for the novel Ubr1-dependent pathway. Some of the involved components in the novel Ubr1-dependent degradation pathway were identified. The remaining factors involved in this degradation pathway and the degradation mechanism can be explored in future.

3 Einleitung

3.1 Das sekretorische System und die Proteinqualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum

In Eukaryotenzellen ist das sekretorische System aus mehreren membranumschlossenen Organellen aufgebaut. Zu den sekretorischen Proteinen gehören Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparats, der Vakuole bzw. des Lysosoms, der Plasmamembran sowie Proteine, die ihren Bestimmungsort außerhalb der Zelle haben und sekretiert werden. Als sekretorischer Weg wird der Synthese- und Reifungsweg sekretorischer Proteine zu ihrem Wirkungsort genannt. Fast 30% aller neusynthetisierten zellulären Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind Proteine des sekretorischen Weges (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Das ER ist eine Organelle des sekretorischen Systems und stellt den Eintrittsort für Proteine des sekretorischen Weges dar. Nach der Translokation ins ER werden die nativen Polypeptide dort modifiziert, gefaltet und assembliert. Anschließend führt ihr Weg über den Golgi-Apparat an ihren eigentlichen Bestimmungsort.

Eine strenge Proteinqualitätskontrolle (PQC, engl. *protein quality control*) überwacht den Reifungsprozess der Proteine im ER, denn nur richtig modifizierte und gefaltete Proteine können ihre Funktion am Wirkungsort ausführen. Die Eliminierung fehlgefalteter Proteine oder unvollständiger Proteinkomplexe schützt die Zelle vor negativen Auswirkungen. Da die Akkumulation falsch gefalteter Proteine zur Bildung von Proteinaggregaten führen kann, die wiederum die Funktion der Zelle maßgeblich stören und Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob- oder Huntington (PolyQ)-Krankheit (CAG-Wiederholungen in bestimmten Genen) hervorrufen (Taylor *et al.*; 2002; Rutishauser und Spiess, 2002; Kopito, 2000; Goldberg, 2003; Dobson, 2003; Sakahira *et al.*; 2002; Krobitsch und Kazantsev, 2011), existiert ein effizientes Qualitätskontrollsystem im ER, um die Assemblierung und Faltung von sekretorischen Proteinen zu kontrollieren.

Falsch gefaltete Proteine werden durch die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) als solche erkannt, im ER zurückgehalten und der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt. Unter dem Begriff ER-Qualitätskontrolle und assoziierte Degradation (ERQD) lassen sich die Prozesse der ERQC und ERAD zusammenfassen. Ein weiterer mit der ER-Degradation verbundener Schutzmechanismus der Zelle, der sie vor größeren Mengen ungefalteter oder falsch gefalteter Proteine im ER bewahren soll, stellt die sogenannte *Unfolded Protein Response* (engl., UPR) dar (Cox und Walter, 1996). Dieser Weg wird durch viele ungefaltete Proteine im ER initiiert. Dabei fungiert in *S. cerevisiae* Zellen die membrandurchspannende Proteinkinase/Endoribonuklease Ire1 als Sensor für

fehlgefaltete Proteine und übermittelt in ihrer aktiven Form ein Signal ins Zytosol bzw. den Zellkern (Patil und Walter, 2001). Die daraufhin induzierte Synthese des Transkriptionsfaktors Hac1 ermöglicht die Expression von über 300 Proteinen, die unterschiedliche Aufgaben als Komponenten der ERQC, des ERAD und bei der Proteinfaltung erfüllen, um die Zelle zu schützen (Mori *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1998; Casagrande *et al.*, 2000; Friedländer *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000).

3.2 Proteinimport ins Endoplasmatische Retikulum

Die an zytosolischen Ribosomen synthetisierten nativen Polypeptide werden aufgrund ihrer N-terminalen Signalsequenz über den Importkanal Sec61 in das ER transloziert. Bei dem sogenannten kotranslationalen Proteinimport wird die Translation nach dem Andocken an den Sec61-Komplex, der in *S. cerevisiae* aus Sec61, Sss1 und Sbh1 besteht, fortgesetzt (Corsi und Schekman, 1996; Haigh und Johnson, 2002). Die Proteine Sec63, Sec66 und Sec72 sind zusätzlich an diesem Prozess beteiligt (Jermy *et al.*, 2006). Während in Säugertierzellen diese Art des kotranslationalen Proteinimports dominiert (Alder und Theg, 2003), werden die meisten Proteine in *S. cerevisiae* hauptsächlich posttranslational importiert. Da die neusynthetisierten Polypeptide erst im ER ihre native Konformation erhalten, sind sie während der Translation und des Imports stets durch die Chaperone Kar2/BiP, Lhs1 und Sil1 vor ungewollter Akkumulation und vorzeitigem Abbau geschützt. Die posttranslationale Translokation verläuft SRP (engl. *signal recognition particle*) unabhängig, jedoch benötigt der Sec61-Komplex eine zusätzliche Komponente, das Protein Sec62.

Der Beginn der Proteinfaltung der sezernierten Proteine im ER initiiert die Einnahme ihrer globulären, nativen Struktur. Zur korrekten Faltung der Proteine im ER tragen die Ausbildung von Disulfidbrücken, die Anheftung und Modifikation von Kohlehydratstrukturen, spezifische proteolytische Spaltungen sowie die Aktivität von Chaperonen bei (Hebert und Molinari, 2007; Hendershot, 2004).

3.3 Die Erkennung von fehlgefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum

Damit fehlgefaltete Proteine, nicht assemblierte Proteinkomplexe oder unmodifizierte Proteine nicht in den Golgi-Apparat und an ihren Bestimmungsort gelangen, existiert die ERQC. Sie sortiert fehlerhafte Proteine aus, die für die Zelle potentiell gefährlich sind und anhand hydrophober Bereiche, reaktiver Thiole oder dem Status der Glykane erkannt werden. Da vielen Proteinen die für ihre Aktivität notwendigen Modifikationen fehlen, ist es nicht möglich ihre Funktionalität zu überprüfen. Dies führt dazu, dass die Qualitätskontrolle beispielsweise auch Proteine aussortiert, die Mutationen tragen, aber funktional wären. Die Ursache der Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) liegt

beispielsweise im Abbau des mutierten und fehlgefalteten, jedoch weiterhin funktionstüchtigen Transportproteins CFTR (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Es muss also Komponenten in der Zelle geben, die die möglichen Substrate erkennen und entscheiden, welche davon im ER zurückgehalten und anschließend dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zum Abbau zugeführt werden.

Eine Modifizierung mit Glykanen findet im ER bei den meisten sekretorischen Proteinen statt. Es gibt unterschiedliche Formen der Glykosylierung. Die *N*-Glykosylierung tritt überwiegend (ca. 90%) auf, wobei die Oligosaccharidstrukturen auf die Aminogruppe der Asparaginseitenkette übertragen werden. Bei der *O*-Glykosylierung werden dagegen die Oligosaccharidstrukturen auf den Sauerstoff an der Seitenkette einer Hydroxylgruppe tragenden Aminosäure übertragen. Die *N*-Glykosylierung trägt zur Erhöhung der hydrophilen Eigenschaften der Glykoproteine bei und beeinflusst daher die Proteinfaltung direkt. Die gewonnene Stabilität schützt zudem vor proteolytischem Abbau. Darüber hinaus fungieren die *N*-Glykane als Liganden für Proteine, die bei der Faltung helfen und diese koordinieren (Helenius und Aebi, 2004; Lehle *et al.*, 2006).

Während des Importprozesses wird vom Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST) ein fertig zusammengebautes Glykan der Struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ auf einen Asparaginrest in der Konsensussequenz N-X-S/T (N=Asparagin, S=Serin, T=Threonin, X=beliebige Aminosäure außer Prolin) übertragen (Nilsson und Heijne, 1993). Die äußeren zwei der drei Glukosereste werden während des Faltungsprozesses durch die Glukosidase I und Glukosidase II relativ schnell abgespalten (Helenius und Aebi, 2001) (Abbildung 3.1). Die nun vorherrschende Struktur $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ erlaubt die Bindung der molekularen Chaperone Calnexin und Calreticulin (Cne1 in *S. cerevisiae*; Xu *et al.*, 2004) in höheren Eukaryoten. Letztlich wird der verbleibende Glukoserest durch die Glukosidase II abgespalten und ein fertig gefaltetes, natives Protein, das die Kohlenhydratstruktur $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ trägt, wird aus dem ER ausgeschleust und an seinen Bestimmungsort transportiert. Der Faltungsprozess wird über den Faltungssensor UDP-Glukose:Glykoprotein Glukosyltransferase (UGGT) überwacht. Dieser kann bei unvollständiger Faltung erneut einen Glukoserest hinzufügen (Zapun *et al.*, 1999) und erlaubt dem zu faltenden Protein erneut an Calnexin/Calreticulin zu binden, um den Faltungsvorgang fortzusetzen. Die langsam reagierende ER α -Mannosidase I (Mns1) verkürzt als erstes den mittleren Oligosaccharidzweig B (Knop *et al.*, 1996; Jakob *et al.*, 1998).

Eine Gruppe der Klasse I Mannosidasen (Familie 47 Glykosylhydrolasen), denen eine Mannosidase-homologe Region gemein ist und als Mnl1/Htm1 in *S. cerevisiae* sowie als EDEM1-3 (engl. *ER-degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*) bezeichnet werden, sind an der weiteren Demannosylierung der Glykoproteine beteiligt (Hirao *et al.*,

2006; Olivari *et al.*, 2006). EDEM1 spaltet die terminale Mannosidase des A-Zweiges ab, wodurch die UGGT nicht mehr binden kann und sich ablöst (Clerc *et al.*, 2009). Dadurch wird das Glykoprotein aus dem schützenden Reglykosylierungszyklus entfernt (Olivari *et al.*, 2006; Molinari, 2007). EDEM3 prozessiert die Glykoproteine auf dem C-Zweig weiter, was zu dem terminalen Abbausignal führt und die fehlgefalteten Glykoproteine gezielt der Degradation überführt (Hirao *et al.*, 2006; Clerc *et al.*, 2009).

In *S. cerevisiae* läuft ein ähnlicher Mechanismus ab (Abbildung 3.1). Jedoch fehlt der Bäckerhefe der Calnexin/Calreticulin-Zyklus, weshalb eine Reglykosylierung nicht stattfinden kann (Fernandez *et al.*, 1994). Die im Vergleich zu Glukosidase I und II kinetisch langsam arbeitende Mannosidase I spaltet direkt den α -1,2-gebundenen Mannoserest auf dem B-Zweig ab und legt somit das Zeitfenster fest, in dem ein Protein gefaltet oder bei unvollständiger Faltung dem Abbau zugeführt wird (Su *et al.*, 1993; Helenius *et al.*, 1997). Die entstandene $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Struktur wird von Mnl1/Htm1 erkannt (Liu *et al.*, 1997; Jakob *et al.*, 1998a; Yang *et al.*, 1998), das wie EDEM zu der Klasse I Mannosidasen homolog ist und eine Mannosidase-homologe Region besitzt. Der terminale α -1,3-Mannosylrest, der durch die Mannosidase I generiert wurde, ist für die Erkennung durch Mnl1/Htm1 essentiell (Clerc *et al.*, 2009). Sobald die spezifisch modifizierten *N*-Glykane als Abbausignal dienen, wird ein Lektin benötigt, welches die $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ -Struktur entziffern kann. Das Lektin Yos9 besitzt eine Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-homologe (MRH) Domäne und bevorzugt Glykanstrukturen mit α -1,6 verbundenen Mannosen (Quan *et al.*, 2008), sowie eine Man_5 -Struktur, wie sie durch Mnl1/Htm1 und möglicherweise eine weitere GH47 α -1,2-Mannosidase, Mnl2, erzeugt werden (Aebi *et al.*, 2010; Martinez-Benitez *et al.*, 2011). Yos9 kann das Oligosaccharidsignal entschlüsseln und leitet in Zusammenarbeit mit Hrd3 die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Degradation der Glykoproteine ein (Buschhorn *et al.*, 2004; Bhamidipati *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Szathmary *et al.*, 2005; Denic *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006).

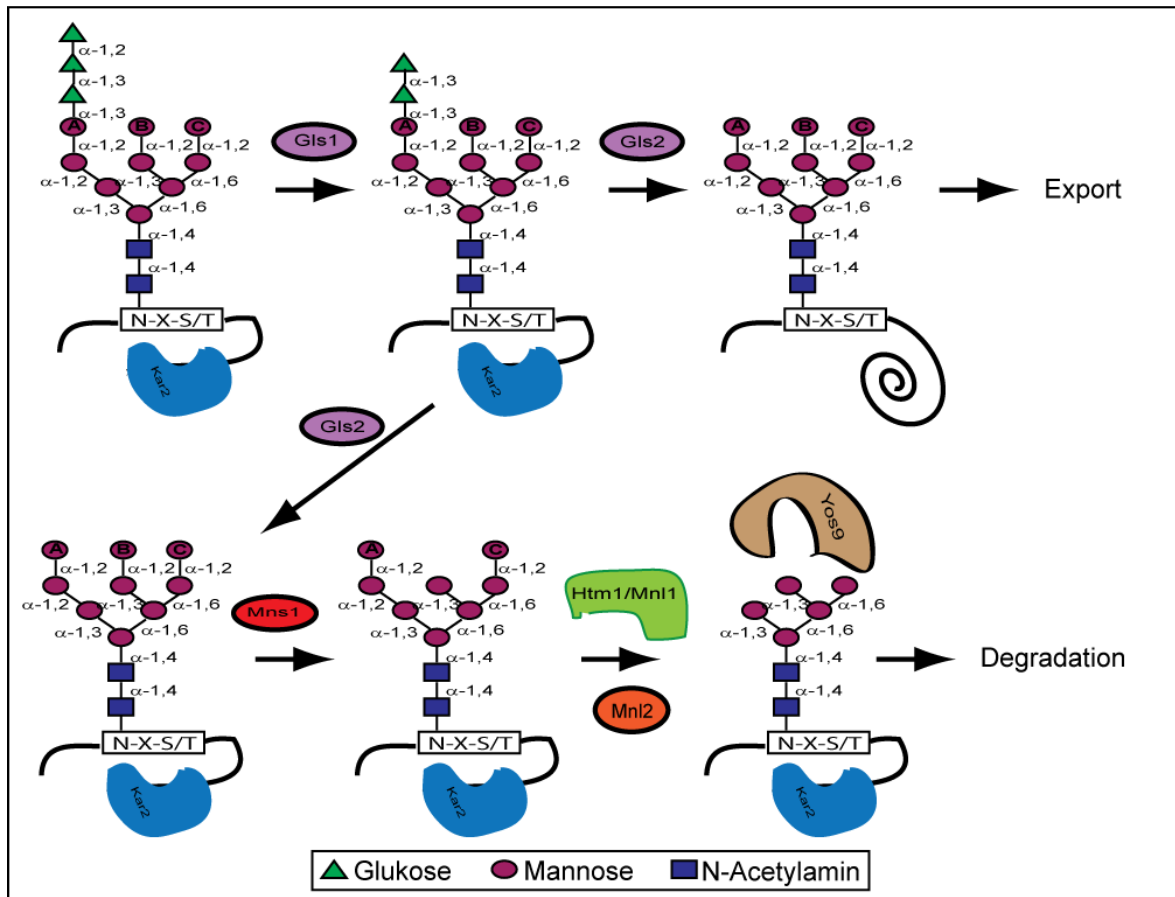


Abbildung 3.1: Die Prozessierung der Glykoproteine während der ERQC in *S. cerevisiae*. Die Glykangrundstruktur der Proteine wird nach dem Import ins ER durch vier Enzyme wieder verkürzt. Die fehlgefalteten Glykoproteine werden aufgrund ihres Glykosylierungsmusters erkannt und dem ERAD Weg zugeführt.

3.4 Die Retrotranslokation von fehlgefalteten Proteinen aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol

Für den Abbau bestimmte sekretorische Proteine werden sowohl über ihr Glykosylierungsmuster als auch hydrophobe Bereiche, die sich bei nativen Proteinen im Inneren befinden, erkannt und im ER zurückgehalten. Chaperone der Hsp70-Familie, wie Kar2, oder Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) sind für die Dislokation und den Abbau der fehlgefalteten Proteine erforderlich (Plemper *et al.*, 1997; Gillece *et al.*, 1999; Clerc *et al.*, 2009). Kar2 schützt darüber hinaus auch ungefaltete Proteine vor deren Aggregation im ER. Mit Hilfe seiner Bindungspartner Scj1 und Jem1 hält Kar2 die Substrate in einem geschützten Zustand, der die Retrotranslokation ins Zytosol ermöglicht (Nishikawa *et al.*, 2001).

3.4.1 Der Importkanal Sec61

Sekretorische Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, müssen das ER verlassen, um dem zytosolisch lokalisierten Proteasom zugänglich zu werden. Einige Studien implizieren, dass Komponenten des Importkanals auch den Export der Substrate vermitteln. So wird beispielsweise vermutet, dass die porenformgebende Untereinheit

Sec61 des Importkanals in die Retrotranslokation involviert ist. Sec61 konnte bei gleichzeitig inhibiertem Proteasom zusammen mit ERAD-Substraten aufgereinigt werden (Wiertz *et al.*, 1996). Zudem zeigten besondere Varianten von Sec61-Mutanten einen verlangsamten Abbau von ungefalteten Proteinen, während der Import funktional war (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2008). Erst kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass Sec61 nicht nur mit einem ERAD-Substrat, sondern auch mit einer Komponente des Retrotranslokationskomplexes (RTK) koimmunpräzipitiert werden kann (Schäfer *et al.*, 2009). Die meisten dieser beobachteten Ergebnisse beweisen allerdings nur indirekt eine Beteiligung von Sec61 am Export, daher ist unwahrscheinlich, dass für den Rücktransport der ungefalteten Proteine ins Zytosol genau der gleiche Kanal verwendet wird. Unklar ist vor allem, wann Proteine nach dem Import vollständig vom Sec61-Komplex dissoziiert sind. So könnten die beobachteten Wechselbeziehungen von ERAD-Substraten und Sec61 von nicht oder nur langsam gelösten Interaktionen des Importkanals auftreten. Strukturelle Analysen des bakteriellen SecYEG Kanals, der eine hohe Homologie zum Sec61-Translokon aufweist, belegen, dass die enge Öffnung des Kanals nur entfaltete Proteine transportieren kann (Van den Berg *et al.*, 2004). Die meisten ERAD-Substrate haben jedoch eine partielle Faltung im ER erfahren, die vor dem Export nicht wieder vollständig aufgelöst wurde (Tirosh *et al.*, 2003). Außerdem tragen die meisten zum Abbau bestimmten Proteine komplexe Kohlenhydratketten, die nur nach dem Rücktransport ins Zytosol von der zytosolischen *N*-Glykanase Png1 entfernt werden kann. Ferner ist der Importkanal in seinem inaktiven Zustand mit einem sogenannten Abdeckstopfen verschlossen. Die Einführung eines naszierenden Polypeptides von der zytosolischen Seite verdrängt den Abdeckstopfen (Li *et al.*, 2007). Zu exportierende Substrate würden dagegen von der ER-luminalen Seite gegen den Abdeckstopfen drücken und diesen festklemmen. Daher müssen Alternativen betrachtet werden, die einen Kanal für den Rücktransport der Proteine bilden können, wie beispielsweise verschiedene Komponenten des ERAD. Der1 als auch die ERAD-Ligasen Der3/Hrd1 und Doa10 besitzen transmembrandurchspannende Domänen, die mit der Beteiligung von Sec61 in der Lage wären, einen Retrotranslokationskanal zu bilden. Nur die Isolierung des Exportkanals wird dessen Identifizierung endgültig abschließen können.

3.5 Die AAA-ATPase Cdc48 und ihre Kofaktoren

Der Export der fehlgefalteten Proteine erfolgt gerichtet. Der Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex übt an der zytosolischen Seite des ERs vermutlich eine ziehende Kraft aus, die die Proteine aus dem ER oder der ER-Membran extrahiert (Jarosch *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003). Schon während der Retrotranslokation werden die Substrate ubiquitiniert,

womit wahrscheinlich auch ein Zurückrutschen der Proteine ins ER verhindert wird (Jarosch *et al.*, 2002).

3.5.1 Cdc48

Das hoch konservierte Cdc48-Protein (p97 oder VCP in höheren Eukaryoten) gehört zur Familie der Typ II AAA-ATPasen (engl. *ATPas*es *associated with a variety of cellular activities*) und stellt einen homohexameren, essentiellen Chaperon-verwandten Proteinkomplex dar. Die Entdeckung von Cdc48 (engl. *cell division cycle*) geht auf eine Mutante der Bäckerhefe zurück, die im Zellzyklus arretiert (Moir *et al.*, 1982). Seitdem wurden zahlreiche Funktionen von Cdc48 entdeckt. So spielt es beispielsweise im Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System, der homotypischen Membranfusion, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, dem Zellzyklus und vielen weiteren zellulären Funktionen eine Rolle (Ye, 2006; Stolz *et al.*, 2011). Cdc48 ist als ringförmiger Komplex aus sechs identischen Untereinheiten aufgebaut. Es besteht aus zwei aufeinanderfolgenden ATPase-Domänen, D1 und D2, einer aminoterminalen Domäne, die hauptsächlich für die Bindung von Kofaktoren und Substraten verantwortlich ist und einer verkürzten C-terminalen Domäne (Rouiller *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Rouiller *et al.*, 2002; Beuron *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2005). Cdc48 besitzt die Fähigkeit, oligoubiquitinierte Proteine zu binden und von ihren Bindungspartnern zu trennen oder sie aus Proteinkomplexen herauszuziehen. Diese Befähigung (engl. *segregase-activity*) wird durch die ATPase-Aktivität vermittelt, die die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende chemische Energie in mechanische Kraft übersetzt, wodurch der äußere Kranz des ringförmigen Enzyms sich zu bewegen beginnt und teilweise anfängt zu rotieren. Cdc48 kann direkt über seine N-terminale Domäne ubiquitinierte Substrate binden. Hauptsächlich bindet Cdc48 jedoch indirekt über sogenannte Substrat-rekrutierende Kofaktoren (engl. *substrate-recruiting cofactors*) an ubiquitinierte Substrate. Neben der Extraktion von Proteinen kontrolliert Cdc48 auch den Grad der Ubiquitinierung von gebundenen Substraten. Diese Funktion wird durch sogenannte Substrat-prozessierende Kofaktoren (engl. *substrate-processing cofactors*) vermittelt. Es scheint so, dass Cdc48 eine molekulare Gangschaltung im UPS darstellt, die das Ausmaß der Ubiquitinierung direkt beeinflusst (Jentsch und Rumpf, 2007).

3.5.2 Substrat-rekrutierende Kofaktoren

Zu den Substrat-rekrutierenden Kofaktoren gehören auf der einen Seite der Ufd1-Npl4-Komplex, auf der anderen Seite die Ubx-Protein-Familie, die aus sieben Ubx-Proteinen (Ubx1–Ubx7) besteht, wovon Ubx1/Shp1 das bekannteste ist (Jentsch und Rumpf, 2007).

3.5.2.1 Der Ufd1-Npl4-Komplex

Ufd1 interagiert sowohl mit Cdc48 als auch mit Npl4. Es besitzt eine N-Domäne, die der Cdc48 N-Domäne gleicht. Dagegen besitzt Npl4 eine N-terminale Domäne, die mit der N-Domäne von Cdc48 in Interaktion tritt. Solche Domänen werden als UBX-ähnliche Domänen klassifiziert.

3.5.2.2 Die Ubx-Protein-Familie

Ubx-Proteine weisen eine sogenannte UBX-Domäne auf, die die N-terminale Domäne von Cdc48 bindet, und eine sogenannte UBA- (engl. *ubiquitin-associated*) Domäne, die für die Bindung der ubiquitinierten Substrate verantwortlich ist. Dadurch fungieren Ubx-Proteine als Adaptoren für Cdc48, die die Interaktion mit ubiquitinierten Substraten regulieren (Schuberth und Buchberger, 2008).

3.5.3 Substrat-prozessierende Kofaktoren

Zu den Substrat-prozessierenden Kofaktoren gehören das E4-Enzym Ufd2, das WD-40-Protein Ufd3 und das deubiquitinierende Enzym Otu1.

Ufd2 fördert durch Polyubiquitinierung der Substrate deren proteasomale Degradation und bietet eine physikalische Verbindung zum 26S Proteasom über die proteasomalen Rezeptoren Dsk2 und Rad23 (Richly *et al.*, 2005). Ufd2 ist ein U-box-Domänen-besitzendes Protein und bindet an die zweite AAA-Domäne von Cdc48. Da Ufd3 mit Ufd2 um die gleiche Bindungsstelle an Cdc48 konkurriert (Rumpf und Jentsch, 2006), wird eine weitere Ubiquitinierung durch Ufd2 verhindert. Ufd3 weist eine neue Ubiquitin-Bindedomäne auf, die PFU (engl. *PLAA family ubiquitin binding domain*) bezeichnet wird. Über die PFU-Domäne werden die ubiquitinierten Substrate ohne ATP-Verbrauch gebunden (Mullally *et al.*, 2006). Die C-terminal lokalisierte PUL-Domäne von Ufd3 rekrutiert dagegen Cdc48 zu Ubiquitin. Vor einigen Jahren konnten Ghislain *et al.*, 1996 bereits zeigen, dass die Menge an freiem Ubiquitin in einem *UFD3* deletiertem *S. cerevisiae* Stamm reduziert ist. Otu1 ist der dritte Gegenspieler. Das deubiquitinierende Enzym besitzt eine UBX-ähnliche Domäne und hydrolysiert bevorzugt längere Polyubiquitinketten mit Lys⁴⁸-Verbindungen (Messick *et al.*, 2008).

Der Cdc48-Komplex spielt eine Schlüsselrolle als zentrales Regulierungselement im UPS. Er kann zwischen der Multiubiquitinierung, sowie der Stabilisierung und Deubiquitinierung von Substraten hin und her schalten (Jentsch und Rumpf, 2006).

3.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Bei vielen wichtigen zellulären Prozessen wie dem Zellzyklus, der Proteindegredation, der Apoptose, der DNA-Reparatur und der Antigenpräsentation via MHC I spielt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eine zentrale Rolle (Wolf und Hilt, 2004). Der Abbau über das UPS erfolgt über zwei definierte Schritte. Die abzubauenen Proteine werden zunächst

durch das Ubiquitin-System markiert und anschließend durch das 26S Proteasom degradiert (Heinemeyer *et al.*, 1991b; Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995; Biederer *et al.*, 1996; Hiller *et al.*, 1996; Hershko und Ciechanover, 1998; Glickman und Ciechanover, 2002).

3.6.1 Ubiquitin und die E1-E2-E3-Kaskade

In Eukaryoten wird zur Markierung von zum Abbau bestimmten Proteinen das hoch konservierte, aus 76 Aminosäuren bestehende Protein Ubiquitin verwendet. Unter Verbrauch von ATP wird die Bindung von Ubiquitin an das abzubauen Protein in einer kaskadenartigen Reaktion durch drei Enzymfamilien katalysiert (Glickman und Ciechanover, 2002; Wolf und Hilt, 2004) (Abbildung 3.2). Die Aktivierung des C-Terminus von Ubiquitin erfolgt ATP-abhängig durch Ausbildung einer Thioesterbindung mit dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1. Anschließend folgt der Transfer des aktivierten Ubiquitins auf das katalytische Cystein des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 unter erneutem Aufbau einer energiereichen Thioesterbindung. Zum Schluss wird mittels einer Ubiquitinligase E3 das Ubiquitin über die NH₂-Gruppe eines Lysinrestes am Substrat kovalent verknüpft. Das mit dem Ubiquitin verknüpfte Substrat kann diese Kaskade mehrmals durchlaufen, wobei weitere Ubiquitinmoleküle eine Bindung mit Lysinresten des bereits vorhandenen Ubiquitins eingehen. Ubiquitin selbst kann an verschiedenen Positionen ubiquitiniert werden (Peng *et al.*, 2003). Die Entstehung einer Polyubiquitinkette am Lysinrest der Position 48 stellt dabei ein Signal für den Abbau dar (Chau *et al.*, 1989; Pickart, 2000; Thrower *et al.*, 2000). An Position 63 beispielsweise spielt die Ubiquitinierung eine Rolle bei der DNA-Reparatur (Hofmann und Pickart, 1999).

Die Familie der Ubiquitin-Ligasen lässt sich in RING-E3-Ligasen (engl. *really interesting new gene*) und HECT-E3-Ligasen (engl. *homologous to E6-AP carboxyl terminus*) unterteilen. Die HECT-E3-Ligasen sind direkt am Ubiquitintransfer beteiligt. Dabei übernehmen sie unter Ausbildung einer Thioesterbindung am aktiven Cystein des E3s Ubiquitin von einem spezifischen E2-Enzym. Von dort wird das Ubiquitinmolekül dann direkt auf das Substrat übertragen. Bei den RING-E3-Ligasen dagegen findet eine Bindung des E2s zusammen mit Ubiquitin am E3 statt und die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat erfolgt vom E2 aus. Die RING-E3-Ligase vermittelt offenbar die Substratspezifität zwischen dem spezifischen Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 und dem abzubauen Protein.

In bestimmten Fällen wird zur Elongation der Polyubiquitinketten zusätzlich eine E4-Ubiquitin-Ligase benötigt (Koegl *et al.*, 1999; Crosas *et al.*, 2006; Kohlmann *et al.*, 2008).

Das 26S Proteasom bindet, entfaltet und degradiert die polyubiquitinierten Substrate anschließend (Heinemeyer *et al.*, 1991a; Baumeister *et al.*, 1998). Vor dem Abbau des Substrats im Proteasom muss es darüber hinaus noch deubiquitiniert und deglykosyliert werden. Am Proteasom gebundene Ubiquitinproteasen wie Rpn11 oder Ubp6, sowie das Enzym Png1 übernehmen diese Aufgaben (Verma *et al.*, 2002; Crosas *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

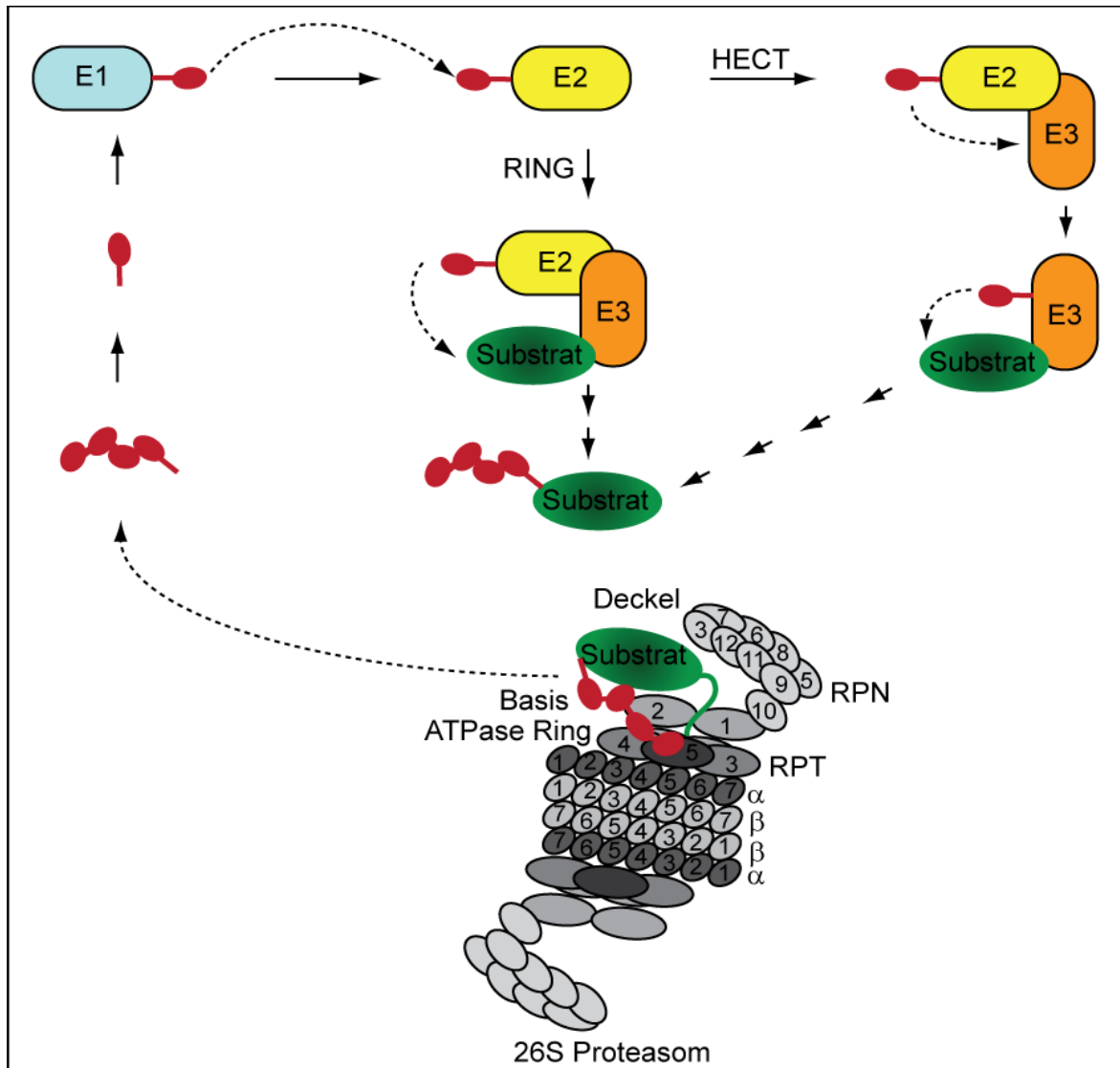


Abbildung 3.2: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Fehlfaltete Proteine werden durch das Ubiquitin-System zum Abbau markiert und anschließend durch das 26S Proteasom degradiert. (nach Wolf und Hilt, 2004)

3.6.2 Das Proteasom

Proteasomen sind Proteinase-Komplexe, die nicht nur im Zytosol, sondern auch im Zellkern vorkommen (Enekel *et al.*, 1998; 1999). Das 26S Proteasom ist aus einem proteolytischen 20S Zylinder und zwei angehefteten regulatorischen 19S Kappen aufgebaut (Abbildung 3.2). Bei den Bezeichnungen 19S, 20S und 26S sind die Sedimentationskonstanten der Partikel in der Einheit Svedberg angegeben.

Das 20S Proteasom gehört zu der Familie der Threonin-Proteasen und hat eine molekulare Masse von etwa 700 kDa. Der 20S Zylinder besteht aus vier übereinander liegender Ringe, die aus sieben unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind. Zwei Ringe werden jeweils zu zwei identischen Subkomplexen zusammengefasst. Die β -Untereinheiten bilden das proteolytisch aktive Zentrum auf der Innenseite des Hohlzylinders (Hilt und Wolf, 1996; Groll *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998). 2004 konnte Heinemeyer *et al.* zeigen, dass der N-terminale Threoninrest der β -Untereinheiten als Nukleophil die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert. Der unspezifische Zutritt von Proteinen wird durch die N-terminalen Reste der α -Untereinheiten, die den 20S Zylinder verschließen, verhindert (Groll *et al.*, 2000; Bajorek und Glickman, 2004; Wolf und Hilt, 2004).

Die seitlich am 20S Proteasom assoziierten 19S Partikel werden in einen Basis- und Deckel-Komplex unterteilt und haben eine molekulare Masse von ca. je 1 MDa. Die sechs funktionellen AAA-ATPase-Untereinheiten Rpt1 – Rpt6 (engl. *regulatory particle triple A protein*) sind zusammen mit den Proteinen Rpn1, Rpn2, Rpn10 und Rpn13 (engl. *regulatory particle non-ATPase*) in der Basis lokalisiert. Die Verknüpfung der Basis mit dem Deckel erfolgt durch die Untereinheit Rpn10. Die sechs ATPase Untereinheiten katalysieren dagegen ATP-abhängig die Bindung und Entfaltung der ubiquitinierten Substrate und regulieren die Translokation in das 20S Proteasom (Braun *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002). Der Deckel-Komplex besteht aus 9 nicht-ATPase-Untereinheiten Rpn3, Rpn5 – 9 und Rpn 11,12,15 (Glickman *et al.*, 1998; Glickman *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2005; Hanna und Finley, 2007). Nach dem Binden der polyubiquitinierten Substrate werden die Ubiquitinketten abgespalten, die Proteine entfaltet und in das proteolytisch aktive Zentrum des 20S Proteasoms gebracht und abgebaut.

3.7 Varianten der ER-assoziierten Degradation

Es ist bekannt, dass der regulierte Abbau von sowohl fehlgefalteten und fehlerhaften Proteinen als auch unvollständig assemblierten Proteinkomplexen für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen bedeutsam ist (Hampton *et al.*, 2002). Die Identifikation verschiedener Komponenten, die an der ERQD beteiligt sind, erfolgte in den letzten Jahrzehnten durch genetische und biochemische Studien. In Abhängigkeit der strukturellen Eigenschaften der fehlgefalteten Zielproteine werden verschiedene Degradationswege innerhalb der ERAD genutzt. ERAD-Substrate werden entsprechend ihrer Degradationswege in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die aktuelle Unterteilung der ERAD-Modelle erfolgt in Abhängigkeit der Lokalisierung der Fehlfaltung im Protein in ERAD-L (Lumen), ERAD-M (Membran) und ERAD-C (Zytosol, engl. *cytosol*) (Abbildung 3.3). Lösliche und membrangebundene Proteine werden dem ERAD-L-Weg

Bays *et al.*, 2001; Deak *et al.*, 2001). Die Interaktion zwischen Der3/Hrd1 und Hrd3, einem Typ I Membranprotein mit langer N-terminal lumenaler Domäne, ist als stabilisierender Komplexpartner für Der3/Hrd1 wichtig (Plempner *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 2000). Yos9 wurde zusammen mit Kar2 im Hrd-Der-Ligase-Komplex gefunden und übergibt die abzubauenen Substrate der Ubiquitin-Ligase zur Polyubiquitinierung (Buschhorn *et al.*, 2004; Denic *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006). Es bindet an die lumenale Domäne von Hrd3 und dient vermutlich als Erkennungsfaktor für Glykoproteine mit einer Man₇GlcNAc₂-Struktur (Clerc *et al.*, 2009) bzw. einer Man₅GlcNAc₂-Struktur (Quan *et al.*, 2008; Martinez-Benitez *et al.*, 2011). Weiter beteiligte Komponenten stellen Usa1 und Der1 dar, wobei Usa1 das vierfach membrandurchspannende Der1 mit der E3-Ligase Der3/Hrd1 verbindet (Knop *et al.*, 1996; Hitt *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). Die kürzlich gezeigte Interaktion des Translokons Sec61 mit dem Hrd-Der-Ligase-Komplex (Schäfer *et al.*, 2009) vergrößert diesen Komplex zu einem Retrotranslokationskomplex (RTK; engl. *retrotranslocation complex*, RTC), welcher die nachfolgenden Schritte der Retrotranslokation und der Polyubiquitinierung verbindet (Eisele *et al.*, 2010). Ubiquitin wird durch das E1-Enzym Uba1 aktiviert und über das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7 (Hiller *et al.*, 1996) mit Hilfe der E3-Ligase Der3/Hrd1 an das Substrat gebunden. Cue1, das membranverankert vorliegt, bindet Ubc7 und führt es zum Ligase-Komplex (Biederer *et al.*, 1997).

Für den ERAD-M-Degradationsweg wird eine leichte Veränderung des ERAD-L-Weges vorgeschlagen. Für den Abbau von Membranproteinen, die eine Fehlfaltung innerhalb der Transmembrandomäne beherbergen, wird ein Modell bevorzugt, dass dem ERAD-L-Weg gleicht, bis auf die beiden Komponenten Usa1 und Der1, die für bisher untersuchte ERAD-M-Substrate entbehrlich waren (Carvalho *et al.*, 2006).

Im ERAD-C-Degradationsweg spielt die E3-Ligase Doa10 die zentrale Rolle (Vashist und Ng, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). Das 14fach die Membran durchspannende Protein besitzt an seinem zytosolisch lokalisiertem N-Terminus eine RING-Finger-Domäne (Swanson *et al.*, 2001). An der Ubiquitinierung ist neben dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc7 auch das E2-Enzym Ubc6 beteiligt (Walter *et al.*, 2001).

Alle diese ERAD-Degradationswege laufen an einem bestimmten Punkt zusammen. Für die Degradation der Substrate ist die Extraktion aus dem ER oder der ER-Membran notwendig. Diese Aufgabe übernimmt der Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex, der durch Ubx2 in der Membran verankert ist (Bays *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Schuberth *et al.*, 2004; Neuber *et al.*, 2005). Die polyubiquitinierten Substrate werden durch die Ubiquitinrezeptorproteine Dsk2 und Rad23 anschließend zum Proteasom eskortiert (Medicherla *et al.*, 2004; Richly *et al.*, 2005).

Untersuchungen mit verschiedenen aufgebauten löslichen und membrandurchspannenden ERAD-Substraten, die im Lumen alle als Degradationsmotiv die mutierte Carboxypeptidase ysc Y (CPY*) tragen, ergaben, dass in Abhängigkeit der Topologie weitere zytosolische Chaperone für den Abbau benötigt werden. Beispielsweise sind für den Abbau des ERAD-L-Substrats CTG*, das im Zytosol das grünfluoreszierende Protein GFP präsentiert, zusätzliche Chaperone der Familien Hsp70, Hsp40 und Hsp100 nötig (Taxis *et al.*, 2003).

3.8 Die Ubiquitin-Ligase Ubr1 und der *N-end rule*-Abbauweg

Die ersten für den Abbau eines Proteins verantwortlichen Signale (Degrons) wurden in den späten 80er Jahren des 20. Jahrhunderts enträtselt (Bachmair *et al.*, 1986; Varshavsky, 1992, 1996a). Durch die Modifizierung des N-Terminus des artifiziellen Substrats Ubiquitin-X- β -Galactosidase mit unterschiedlichen Aminosäuren X wurde die *N-end rule* aufgestellt (Bachmair und Varshavsky, 1989). Die Lebensdauer eines Proteins wird dabei von seiner N-terminalen Aminosäure im Ubiquitin-abhängigen *N-end rule*-Abbauweg bestimmt (Varshavsky, 1997). Die *N-end rule* ist jedoch nicht für alle Abbauege und Substrate gültig. In *S. cerevisiae* wird die E3-Ubiquitin-Ligase des *N-end rule*-Abbaueges durch *UBR1* codiert und ist fähig, *N-end rule*-Substrate zu erkennen (Bartel *et al.*, 1990; Varshavsky, 1996a). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Ubr1 auch für den proteasomalen Abbau von fehlgefalteten zytosolischen Proteinen verantwortlich ist (Eisele *et al.*, 2008).

3.9 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, detailliertere Erkenntnisse im Ablauf der PQC herauszufinden. Im Abbaumechanismus von membrangebundenen Substraten existieren große Unterschiede, die aufgrund fehlender direkt vergleichbarer ERAD-Substrate nicht zu untersuchen waren. Daher sollte der Abbau verschiedener Modellsubstrate mit dem gleichen Degradationssignal und zusätzlicher Transmembran- und zytosolisch unterschiedlichen Domänen verglichen werden. Mittels Degradationsstudien sollten weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen des Abbaus fehlgefalteter Proteine gewonnen und eventuell bisher unbekannte Proteinkomponenten identifiziert werden. Um Unterschiede im Abbau von zytosolisch verschiedenen ERAD-Substraten aufzudecken, wurden drei zytosolisch verschiedenartig aufgebaute Substrate verwendet. Die Substrate enthielten dabei alle die mutierte Carboxypeptidase ysc Y (CPY*) im ER-Lumen und waren über die letzte Transmembrandomäne des ABC-Transporterproteins Pdr5 an ihre jeweiligen zytosolischen Domänen fusioniert. Die zytosolischen Domänen unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich der Stärke ihrer Faltung. Es müssen Kräfte zum Entfalten der zytosolischen Domänen der ERAD-Substrate aufgebracht werden. Diese Kräfte der

Faltung der zytosolischen Domänen der ERAD-Substrate stellen dabei ein zentrales Kriterium in den Untersuchungen dar. Unter anderem konnte so ein neuer Ubr1-abhängiger Degradationsweg identifiziert werden. Durch verschiedene Analysen sollte die Beteiligung weiterer Komponenten und deren Funktionen ausführlicher bestimmt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Geräte

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Firma	Chemikalien, Materialien
Amersham Biosciences , Little Chalfont, UK	CDP-Star™ Detection Reagent Hybond™-N+ Membran Hyperfilm ECL™ Protein A Sepharose CL-4B
Bioline , London, UK	Velocity™ DNA Polymerase
Biomers , Ulm, Deutschland	Oligonukleotide
Difco , Detroit, USA	<i>Bacto</i> ® Agar <i>Bacto</i> ® Pepton <i>Bacto</i> ® Trypton Hefeextrakt Yeast nitrogen base w/o amino acids
Eurofins MWG Operon , Ebersberg, Deutschland	Oligonukleotide
Fermentas , Ontario, Kanada	Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder PageRuler™ Prestained Protein Ladder PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus Restriktionsendonukleasen T4 DNA Ligase
Finnzymes , Espoo, Finnland	Phusion™ DNA Polymerase
Fisher Scientific , Loughborough, Leicestershire, UK	Aceton Chloroform
Fluka , via Sigma-Aldrich ®	Methotrexat
Genaxxon Bioscience GmbH , Stafflangen, Deutschland	GenAgarose LE Geneticin Nukleotid-Set Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Taq Polymerase E
Hartmann Analytic GmbH , Braunschweig, Deutschland	³⁵ S-Methionin Trans- ³⁵ S-Label
Kodak , Stuttgart, Deutschland	BioMax MR Film
MACHEREY-NAGEL , Düren, Deutschland	NucleoSpin® Extract II PCR clean-up Gel extraction Kit
Merck , Darmstadt, Deutschland	DMSO Kaliumacetat Kaliumchlorid β-Mercaptoethanol MG-132 TEMED
Millipore , Billerica, USA	MF™-Membran Filter
New England Biolabs , Ipswich, USA	Restriktionsendonukleasen 1 kb DNA Ladder Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Vent _R DNA Polymerase
Pall Corporation , Pensacola, USA	BioTrace™ NT

PEQLAB Biotechnologie GmbH , Erlangen, Deutschland	peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit pgeGOLD Gel Extraction Kit
Perkin Elmer , Shelton, USA	Count-off™
Promega , Madison, Wisconsin, USA	pGEM®-T Vektor System I
Quiagen , Venlo, Niederlande	QIAprep® Gel Extraction Kit QIAquick® PCR Purification Kit
Roche , Basel, Schweiz	Alkaline Phosphatase, shrimp Ampicillin, complete™ Inhibitor-Cocktail, Hering-Sperma-DNA, Nukleotid-Set, Taq DNA Polymerase, T4 DNA Ligase, Restriktionsendonukleasen
Carl Roth GmbH + Co. KG , Karlsruhe, Deutschland	Ammoniumacetat, Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenolblau, DNA-Marker 1kb Leiter, EDTA, <i>D</i> -Glucose, Glycerin, <i>L</i> -Glycin, Harnstoff, HEPES, IPTG, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Phenol, TE-gesättigt (<i>Roti</i> ®-Phenol), PMSF, <i>D</i> -Saccharose, Trichloressigsäure, Tris, TritonX-100, Tween 20, X-Gal
Sartorius , Göttingen, Deutschland	Glasperlen Ø 0,40-0,60mm Glasperlen Ø 5mm
Schleicher & Schuell , Dassel, Deutschland	Blotting Papier GB 002 Blotting Papier GB 003
Seigagaku Kyogo , Tokyo, Japan	Zymolyase 100-T
Sigma-Aldrich ®, Deisenhofen, Deutschland	Adenin, <i>L</i> -Alanin, Aprotinin, <i>L</i> -Arginin, <i>L</i> - Asparagin, <i>L</i> -Asparaginsäure, Benzamidin, Cycloheximid, <i>L</i> -Cystein, EDTA, Ethidiumbromid, 5`-FOA, <i>D</i> -Galactose, <i>L</i> - Glutamin, <i>L</i> -Glutaminsäure, <i>L</i> -Histidin, <i>L</i> - Isoleucin, <i>L</i> -Leucin, Leupeptin, Lithiumacetat, <i>L</i> -Lysin, Lysozyme, <i>L</i> - Methionin, PEG 3350, Pepstatin A, <i>L</i> -Phenylalanin, Ponceau S, <i>L</i> -Prolin, Proteinase K, Rinderserumalbumin (BSA), RNase A, SDS, <i>L</i> -Serin, <i>D</i> -Sorbit, <i>L</i> - Threonin, <i>L</i> -Tryptophan, <i>L</i> -Tyrosin, Uracil, <i>L</i> -Valin
Thermo SCIENTIFIC , Rockford, USA	Pierce® ECL Western Blotting Substrate
VWR International GmbH , Darmstadt, Deutschland	Essigsäure Ethanol Isopropanol Methanol

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

4.1.2 Geräte

Firma	Bezeichnung
Bio-Rad , Hercules, USA	DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen Elektroporations-Apparatur <i>Gene Pulser™</i> Mini- <i>PROTEAN®</i> -Tetra Cell Mini Trans-Blot Cell Netzgerät <i>Power-Pac™ 200/2.0</i> Netzgerät <i>Power-Pac™ 300</i> Netzgerät <i>Power-Pac™ Basic</i> Protein-Gelelektrophorese-Apparatur <i>Protean II</i> Protein-Gelelektrophorese-Apparatur <i>Protean IV</i>
Eckert&Ziegler Nuclitec , Braunschweig, Deutschland	Entsorgung radioaktiver Abfall
EG&G Berthold , Bad Wildbad, Deutschland	β/γ -Monitor <i>LB145 V1.9</i> Gerät z. Messen v. Radioaktivität <i>LB1210B</i>
Eppendorf , Hamburg, Deutschland	Thermomixer <i>5437</i> Tischzentrifuge <i>5415 C</i> Tischzentrifuge <i>5804 R</i> Hermle Z 320K
Grant Instruments , Shepreth, UK	Plattformschüttler <i>VSR23</i>
Haake , Karlsruhe, Deutschland	Wasserbad <i>W13/F3</i> Wasserbad <i>SWB25</i>
Heraeus , Hanau, Deutschland	Biofuge fresco Biofuge pico
ITF Labortechnik , Wasserburg, Deutschland	Semidry-Blot-Apparatur
Liebisch , Bielefeld, Deutschland	Heizblock
Mettler Toledo , Giessen, Schweiz	Feinanalysenwaage <i>AE 163</i> Analysenwaage <i>PM 460</i>
Millipore , Eschborn, Deutschland	Ionenaustauscher <i>Milli-Q Plus</i>
Molecular Dynamics , Sunnyvale, USA	PhosphorImager <i>Storm 860</i>
MWG Biotech , München, Deutschland	Videoprinter für Agarosegele
Pharmacia Biotech , Uppsala, Schweden	Spektralphotometer <i>Novaspec II</i>
Protec Medizintechnik , Oberstenfeld, Deutschland	Entwicklungsmaschine <i>Optimax</i>
Schott , Hofheim, Deutschland	pH-Meter <i>CG 820</i>
Scientific Industrie , New York, USA	Disruptor Genie Roto-Shake Genie Vortex-Genie 2
Snijders Scientific , Tilburg, Niederlande	Überkopfschüttler <i>34528</i>
Thermo SCIENTIFIC , München, Deutschland	Sorvall <i>RC5B</i> Sorvall <i>RC6+ Centrifuge</i>
Vacuubrand , Wertheim, Deutschland	Membran-Vakuumpumpe <i>MD4C</i>
VWR International , Darmstadt, Deutschland	Kühlzentrifuge himac <i>CT15RE</i> Zentrifuge <i>Galaxy 14D</i>

Tabelle 4.2: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

4.1.3 Antikörper

4.1.3.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Quelle/Referenz
Kaninchen- α -Kar2	WB: 1:1000	P. Walter
Kaninchen- α -CPY	IP:1:300; WB: 1:5000	Rockland; 200-401-135
Kaninchen- α -Der3F	WB: 1:1000	J. Bordallo, Stuttgart
Kaninchen- α -GFP	IP: 1:300; WB: 1:500	Molecular Probes; A6455
Kaninchen- α -Sec61	WB: 1:10000	T. Sommer, Berlin
Maus- α -DHFR	WB: 1:5000	BD Biosciences
Maus- α -myc	IP: 1:150 WB: 1:5000	Santa Cruz Biotechnology
Maus- α -myc	IP: 1:600	Sigma
Maus- α -PGK	WB: 1:10000	Molecular Probes; A6457
Maus- α -Ubiquitin	WB: 1:2000	Covance
Maus- α -CPY	WB: 1:5000	Dianova, Hamburg

Tabelle 4.3: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper.

4.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Quelle/Referenz
Ziege- α -Kaninchen	1:10000; 3% Milchpulver	Caltag Laboratories; L42007
Ziege- α -Maus	1:10000; 3% Milchpulver	Jackson ImmunoResearch; 115-035-116

Tabelle 4.4: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper.

4.1.4 Organismen

4.1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

In Tabelle 4.5 sind sämtliche Hefestämme, die für diese Arbeit verwendet wurden, und solche, die neu daraus hervorgingen, aufgelistet. Detailliertere Angaben zur Herstellung der jeweiligen neuen Stämme finden sich in Kapitel 4.3.1.

Bezeichnung	Genotyp	Quelle/Referenz
YWO 0357	W303 – 1A <i>ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1^{oc} can1-100 gal2 MATa</i>	Chiang und Schekmann, 1991
YWO 0342	W303 – 1B <i>ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1^{oc} can1-100 gal2 MATα</i>	Chiang und Schekmann, 1991
YWO 1580	W303 – 1A <i>prc1::LEU2 MATa</i>	Plemper, 1999
YWO 636	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 MATα</i>	Plemper, 1999
YWO 1089	W303 – 1B <i>prc1-1 MATα</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996a
YWO 1652	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 hrd3ΔHIS5⁺ MATα</i>	diese Arbeit
YWO 1408	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3 MATα</i>	L. Xiao
YWO 1590	W303 – 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔloxP ssa2ΔloxP ssa3::ΔHIS5⁺ MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1710	W303 – 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔloxP ssa2ΔloxP ssa3::ΔHIS5⁺ ssa1-45^{ts} MATa</i>	diese Arbeit
YPD5	W303 – 1B <i>ydj1-2::HIS3 LEU2::ydj1-151 MATα</i>	P. Deak, 2001

YWO 1719	W303 – 1B <i>ydj1-2::HIS3 LEU2::ydj1-151 prc1ΔkanMX MATα</i>	diese Arbeit
YFE 17	W303 – 1B <i>cdc48^{T413R} MATα</i>	F. Eisele
YWO 1711	W303 – 1B <i>prc1ΔkanMX cdc48^{T413R} MATα</i>	diese Arbeit
YWO 1312	W303 – 1B <i>prc1-1 ufd2ΔkanMX MATα</i>	S. Kohlmann
YWO 1708	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 ufd2ΔkanMX MATα</i>	diese Arbeit
YJMR2	W303 -1B <i>otu1ΔkanMX6 MATα</i>	L. Barbin
YWO 1720	W303 – 1B <i>prc1ΔkanMX otu1ΔloxP MATα</i>	diese Arbeit
YWO 1320	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 hul5ΔHIS3 MATα</i>	Kohlmann <i>et al.</i> , 2008
RSY 801 (173) YWO 1715	<i>ade2-101, leu2-3, -113, ura3-52, G418 sensitive MATa</i>	J. Brodsky, 1999
MS 1111 (184) YWO 1716	<i>ade2-101, leu2-3, -113, ura3-52, G418 sensitive, kar2-1 MATa</i>	J. Brodsky, 1999
MS 193 (185) YWO 1717	<i>ade2-101, leu2-3, -113, ura3-52, G418 sensitive, kar2-133 MATa</i>	J. Brodsky, 1999
YM 16 YWO 1723	<i>ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 MATα</i>	Takeuchi <i>et al.</i> 2006a
YM 18 YWO 1724	<i>ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1-2 MATα</i>	Takeuchi <i>et al.</i> 2006a
YM 88 YWO 1727	<i>ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2-1::LEU2 MATα</i>	Takeuchi <i>et al.</i> 2008
YM 89 YWO 1728	<i>ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2-1::LEU2 rot1-2 MATα</i>	Takeuchi <i>et al.</i> 2008
YRH 023	W303 - 1A <i>prc1-1 hsp104ΔkanMX MATa</i>	Taxis <i>et al.</i> , 2003
YWO 1721 YSB 24	W303 - 1A <i>prc1ΔkanMx hsp104ΔloxP MATa</i>	diese Arbeit
YFE 2	W303 1A <i>prc1-1 ubr1ΔHis5⁺ MATa</i>	F. Eisele
YWO 1730	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der1ΔHis5⁺ MATα</i>	diese Arbeit
YWO 1731	W303 – 1A <i>prc1::LEU2 hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX ubr1ΔHis5⁺ MATa</i>	S. Laure
YWO 1735	W303 - 1A <i>prc1-1 hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX ubr1ΔURA3 MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1527	W303 - 1A <i>prc1-1 der3/hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX MATa</i>	A. Stolz
YWO 1590	W303 - 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔloxP ssa2ΔloxP ssa3::ΔHis5⁺ MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1707	W303 - 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔloxP ssa2ΔloxP MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1696	W303 - 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔloxP ssa2ΔkanMX MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1702	W303 - 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔloxP MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1706	W303 - 1A <i>prc1::LEU2 ssa4ΔHis5⁺ MATa</i>	diese Arbeit
YWO 1336 YSK55	W303 - 1B <i>prc1::LEU2 pdr5::TRP1 MATα</i>	Kohlmann, 2008
YWO 1740	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 pdr5::TRP1 der3/hrd1ΔHis5⁺ MATα</i>	diese Arbeit

YWO 1741	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 pdr5::TRP1 der3/hrd1ΔHis5⁺ doa10ΔkanMX</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1528	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX</i> MAT α	A. Stolz
YWO 0635 YPD22	<i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11 lys2 trp1-Δ1</i> MAT α <i>prc1-1 ssa1-45 ssa2::LEU2 ssa3::TRP1</i> <i>ssa4::LYS2</i>	P. Deak Taxis <i>et al.</i> , 2003
YWO 0640 YPD38	<i>ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1^{oc}</i> <i>can1-100 prc1-1 ubc6ΔLEU2 ubc7ΔLEU2 DER3-</i> <i>3HA-His5⁺</i>	P. Deak
YWO 1840	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 pdr5ΔkanMX</i> <i>der3/hrd1ΔHIS3 doa10ΔloxP</i> MAT α	J. Preissler
YWO 1744	W303 - 1A <i>prc1-1 der3/hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX</i> <i>der1ΔLEU2</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1648	W303 – 1A <i>prc1-1 der3/hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX</i> <i>dfm1::HIS3MX6</i> MAT α	K. Otte
YWO 1746	W303 – 1A <i>prc1-1 der3/hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX</i> <i>dfm1::HIS3MX6 der1ΔLEU2</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1299	W303 - 1A <i>prc1-1 der3/hrd1ΔHIS3 doa10ΔkanMX</i> <i>sec61-2</i> MAT α	L. Xiao
YWO 1801	W303 – 1B <i>prc1ΔkanMX der3/hrd1ΔHis5⁺</i> <i>cdc48^{T413R}</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1803	W303 – 1B <i>prc1ΔkanMX der3/hrd1ΔHis5⁺</i> <i>doa10ΔLEU2 cdc48^{T413R}</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1814	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP ubx2ΔkanMX</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1795	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP hjj1ΔkanMX</i> MAT α	J. Preissler
YWO 1806	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP ubc2ΔURA3</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1812	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP ubc2ΔloxP</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1733	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1817	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP ubc6ΔloxP ubc7ΔkanMX</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1820	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP ubc6ΔloxP</i> MAT α	diese Arbeit
YWO 1810	W303 – 1B <i>prc1::LEU2 der3/hrd1ΔHIS3</i> <i>doa10ΔloxP ubc6ΔURA3</i> MAT α	diese Arbeit

Tabelle 4.5: In dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.

4.1.4.2 *Escherichia coli* Stämme

Die verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F' Phi80dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 lambda- thi-1	Hanahan, 1983

XL1-blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Stratagene
XL10-gold	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet ^R F'[proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]	Stratagene

Tabelle 4.6: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

4.1.5 Plasmide

Eine Auflistung aller verwendeten bzw. hergestellten Plasmide findet sich in Tabelle 4.7. In Kapitel 4.3.2 wird die Herstellung und Verwendung der einzelnen Plasmide ausführlich beschrieben.

#	Bezeichnung	Beschreibung/Genotyp	Herkunft
PWO 0064	pRS313	Shuttle - Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^R) mit <i>HIS3</i> Marker und <i>CEN</i> Sequenz	Sikorski und Hieter, 1989
PWO 0065	pRS314	Shuttle - Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^R) mit <i>TRP1</i> Marker und <i>CEN</i> Sequenz	Sikorski und Hieter, 1989
PWO 0067	pRS316	Shuttle - Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^R) mit <i>URA3</i> Marker und <i>CEN</i> Sequenz	Sikorski und Hieter, 1989
PWO 0063	pRS306	Integrativer Vektor (amp ^R) ohne Hefe-Replikationssequenz mit <i>URA3</i> Marker	Sikorski und Hieter, 1989
PWO 0553	pUG6	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>KAN^R</i>	Güldener, 1996
PWO 1021	pUG27	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>His5⁺</i>	Güldener, 2002
PWO 1022	pUG72	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>URA3</i>	Güldener, 2002
PWO 0558	pSH47	Cre Expressionsplasmid mit <i>CEN</i> Sequenz und <i>URA3</i> Marker	Güldener, 1996
PWO 0560	pSH63	Cre Expressionsplasmid mit <i>CEN</i> Sequenz und <i>TRP1</i> Marker	Güldener, 2002
pCT68	CTG	pRS316-Vektor mit <i>PRC1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:GFP</i> unter <i>TDH3</i> -Promotor	Taxis, 2003
PWO 0621 ZKb95	CTG*	pRS316-Vektor mit <i>prc1-1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:GFP</i> unter <i>PRC1</i> -Promotor	Kostova, 2005
pMA1	CTG*	pRS316-Vektor mit <i>prc1-1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:GFP</i> unter <i>TDH3</i> -Promotor	Taxis, 2003
PWO 1035 pSK7	CTL*myc	pRS316-Vektor mit <i>prc1-1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:LEU2:MYC13</i> unter nicht induziertem <i>GAL4</i> -Promotor	Kohlmann, 2008
PWO 1017 pJ142	CTD*	<i>prc1-1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:DHFR</i> unter <i>TDH3</i> -Promotor	Junko Takeuchi
PWO 1197	CTD*	pRS316-Vektor mit <i>prc1-1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:DHFR</i> unter <i>PRC1</i> -Promotor	diese Arbeit
PWO 1202	CTD*myc	pRS316-Vektor mit <i>prc1-1:TMDpdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂:DHFR:MYC13</i> unter <i>PRC1</i> -Promotor	diese Arbeit
PWO 1025 pCT70	<i>ssa1-45^{ts}</i> CPY	pRS306-Vektor mit <i>ssa1-45^{ts}</i> Sequenz pRS316-Vektor mit <i>PRC1</i> unter <i>TDH3</i> -Promotor	diese Arbeit C. Taxis

pHIT341	CPY*	pRS316-Vektor mit <i>prc1-1</i> unter <i>TDH3</i> -Promotor	R. Hitt
PWO 1195	PT _{PRC1}	pRS316-Vektor mit Promotor und Terminator Sequenz von <i>PRC1</i>	diese Arbeit
PWO 0336	pFA6a-13Myc-kanMX6	<i>E. coli</i> Plasmid zur 13xMyc Markierung mit (<i>kan^r</i>)	Longtine, 1998
PWO 1038 pSK10	HUL5	pRS314-Vektor mit <i>HUL5</i> Sequenz	Kohlmann, 2008
PWO 1039 pSK11	<i>hul5-C878A</i>	pRS314-Vektor mit <i>hul5-C878A</i> Sequenz	Kohlmann, 2008
PWO 1235	Flag-Ubr1	Flag-Ubr1 mit <i>LEU2</i> Marker	Z. Xia

Tabelle 4.7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

4.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3' Richtung angegeben. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen zur DNA Matrize homologe Sequenzen. **Fettgedruckte** Sequenzen markieren die artifiziell eingeführten Restriktionsschnittstellen.

#	Bezeichnung	Sequenz	Größe T _{an}
SB9 forward	Amplifizierung <i>ssa4ΔHis5⁺</i>	TAAACAAAACAATAATCATGTCAAAGCTGTTGG TATTGATTTAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer, 66°C
SB10 reverse	Amplifizierung <i>ssa4ΔHis5⁺</i>	ACTAAGAAATTCGATGCTGCTACTTCATCGCATC TTTGTATTTATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer, 66°C
SB11 forward	Kontrolle <i>ssa4ΔHis5⁺</i>	GTTGATAGCATTCTACCGTC	20mer, 51°C
SB12 reverse	Kontrolle <i>ssa4ΔHis5⁺</i>	CGTGATCTCTGATCCGCTCG	20mer, 58°C
SB30 forward	Amplifizierung <i>ssa3_{1126bp}::His5⁺</i>	TTGTCACTAAACGGATAGAATAGGTAATAAACGC TACAAAGAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer, 58°C
SB93 reverse	Amplifizierung <i>ssa3_{1126bp}::His5⁺</i>	CAGCTTGAACGGCTGCACCATAAGCAACAGCCTCATC CGGGTTGAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer, 58°C
SB49 forward	Kontrolle <i>ssa3_{1126bp}::His5⁺</i>	GCAATGGCATGCTATGATCGAACTG	25mer, 60°C
SB50 reverse	Kontrolle <i>ssa3_{1126bp}::His5⁺</i>	CCAACGACCCAAACGACCAATAGTT	25mer, 61°C
SB37 forward	Amplifizierung <i>ssa2ΔkanMx</i>	GTTACTTCTATTCTTCAATTGATTAATTCCAACAG ATCAAGCAGACAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer, 58°C
SB38 reverse	Amplifizierung <i>ssa2ΔkanMx</i>	ATCGCTAAGCTTAATCAACTTCTTCGACAGTT GGACCTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	61mer, 58°C
SB23 forward	Kontrolle <i>ssa2ΔkanMx</i>	AGCTTGATCCGCTTGTCTGA	20mer, 58°C
SB22 reverse	Kontrolle <i>ssa2ΔkanMx</i>	TGGTTTCGACGGTATAGATG	20mer, 56°C
SB25 forward	Amplifizierung NotI/P/ssa1-45	ATAT GCGGCCGC TGATACTCTGCTCTGTGCT ATCG	35mer, 57°C
SB26 reverse	Amplifizierung <i>ssa1-45/T/SphI</i>	ATAT GCATGC GAGAGGCCCTGGGTTCAATTC CCAGC	36mer, 67°C

MATERIAL UND METHODEN

SB98 forward	SB <i>ssa4ΔloxP</i>	GAGAATTAAGCTAGCGTTGAGGAGG	24mer, 56°C
SB99 reverse	SB <i>ssa4ΔloxP</i>	CTTTCAGCGTTCTTGCTCTTG	21mer, 56°C
SB100 forward	SB <i>ssa2ΔloxP</i>	GCGCTACCTTCTCCTAGTTTATG	23mer, 56°C
SB101 reverse	SB <i>ssa2ΔloxP</i>	ATTGCTCACATCAGACTCAGG	21mer, 56°C
SB102 forward	SB <i>ssa3::ΔHis5⁺</i>	TTTGGACAAAGCTCCCTTACCTG	23mer, 59°C
SB103 reverse	SB <i>ssa3::ΔHis5⁺</i>	AACACTCCCTTCGTGCTTGG	20mer, 59°C
reverse	TEF Promotor	CGCGTCTGTGAGGGGAGCG	19mer
forward	TEF Terminator	CGCCTCGACATCATCTGCC	20mer
SB66 forward	NotI - <u>P_{PRC1}</u>	ATAT GCGGCCGCT <u>ACGGTATGTGTGGCGGT</u>	30mer, 57°C
SB67 reverse	<u>P_{PRC1}</u> - SpeI	ATATA CTAGTAG <u>CGTATGTATACTTTAAGTTGAG TAG</u>	37mer, 54°C
SB70 forward	Sall - <u>T_{PRC1}</u>	ATAT GTCGAC <u>AGCGTGTATGTGTAGGCATACCG T</u>	33mer, 67°C
SB71 reverse	<u>T_{PRC1}</u> - KpnI	ATAT GGTACCT <u>GTCACAACCTGGCCACCA</u>	30mer, 67°C
SB68 forward	SpeI - <u>CT*DHFR</u>	ATATA CTAGT <u>TATGAAAGCATTACCAGTTT</u>	30mer, 57°C
SB69 reverse	<u>CT*DHFR</u> - Sall	ATAT GTCGAC <u>CTAATCATTCTTCTCATATA</u>	30mer, 56°C
SB76 forward	Amplifizierung <i>hrd3ΔHis5⁺</i>	GGCAAATCGCAGTAAGTAAGCAAGTAACGAACT CGCACTTCAGCACAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer, 57°C
SB78 reverse	Amplifizierung <i>hrd3ΔHis5⁺</i>	GGTGATTTCTATGGATAGTCTATGTATATATCTAT ACAAACCACAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer, 58°C
SB60 forward	Kontrolle <i>hrd3ΔHis5⁺</i>	CTTCTGCTGACTTGTATGCC	20mer, 54°C
SB62 reverse	Kontrolle <i>hrd3ΔHis5⁺</i>	TCAGAGCTGGAAGCCAATTG	20mer, 56°C
SB85 forward	Amplifizierung <i>prc1ΔkanMX</i>	CTAGAGATTGTTTCTTTTCTACTCAACTTAAAG TATACATACGCT CAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer, 57°C
SB86 reverse	Amplifizierung <i>prc1ΔkanMX</i>	GATCGTAGCTGATAATAAAAACGGTATGCCTACA CATACACGCT GCATAGGCCACTAGTGGATCTG	66mer, 58°C
SB87 forward	Kontrolle <i>prc1ΔkanMX</i>	GTTAGCAGAGAAGCAAGAAGG	21mer, 54°C
SB88 reverse	Kontrolle <i>prc1ΔkanMX</i>	CACATGTGATAAATTGTGGAATCAG	25mer, 54°C
SB91 forward	Kontrolle <i>ufd2ΔkanMX</i>	CTCTCACTTGAGGAAGCACAC	21mer, 56°C
SB92 reverse	Kontrolle <i>ufd2ΔkanMX</i>	AACAGAGAGGATCATAGCAACC	22mer, 56°C
SB106 forward	Longtine_myc	<u>AGGAGGAGAAAGGCATTAAGTACAAATTTGAAG TATATGAGAAGAATGATCGGATCCCCGGGTTAAT TAA</u>	70mer, 55°C
SB107 reverse	Longtine_myc	<u>TGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACCCTCACTAA AGGGAACAAAAGCTGGGAATTCGAGCTCGTTTA AAC</u>	70mer; 51°C

MATERIAL UND METHODEN

SB108 forward	Amplifizierung <i>ufd3ΔkanMX</i>	TATATTCATGTGTGATAGTAAGGTGTAGAGCA GCAGATTTGGAGT <u>CAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>	64mer; 57°C
SB109 reverse	Amplifizierung <i>ufd3ΔkanMX</i>	AGTAATTTACACCCCAGTTTTTCATTATTGAAG CAATTTACCAAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
<i>ubr1 A</i> forward	Kontrolle	ACCATAAGGCAACTACCCAG	20mer; 55°C
<i>ubr1 D</i> reverse	Kontrolle	AAGCAGCACACACACACAC	19mer; 57°C
SB129 forward	Kontrolle <i>doa10Δ</i>	CATGCGGTGTAAGAGGATGG	20mer; 56°C
SB130 reverse	Kontrolle <i>doa10Δ</i>	CCTCGCATGTTCAATCTCTATCG	23mer; 57°C
P130 forward	Amplifizierung <i>doa10Δ</i>	AAGAGTACCACTAATTGAATCAAAGAGACTAGAA GTGTGAAAGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
P131 reverse	Amplifizierung <i>doa10Δ</i>	GTAATATGCTAGCATTTCATTTTAAATGTAAGGAA GAAAACGCCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
SB137 forward	Amplifizierung <i>der3ΔkanMx</i>	TCAATTGCAATTTGTAAGAGAAGGGGAGAAAG ACAAAATAATAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
SB138 reverse	Amplifizierung <i>der3ΔkanMx</i>	CTATGTATAATATAAAACATGCAATCTAGATATG CTGGATAAATTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
<i>DER3</i> forward	Kontrolle	TCAATTTGCACTATAGCCG	20mer; 55°C
SB128 reverse	Kpnl-T-DER3	ATATGGTACCAGTTCTTCTTGAGTATATAGGAAT TCACA	39mer; 56°C
Ura-C forward	Kontrolle	TTGGCTAATCATGACCCC	18mer; 52°C
Ura-B reverse	Kontrolle	CAGACCGATCTTCTACCC	18mer; 52°C
FPubr1 dis	Amplifizierung <i>ubr1ΔURA3</i>	TCCCTAATCTTTACAGGTCACACAAATTACATA GAACATTTCCAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
RPubr1 dis	Amplifizierung <i>ubr1ΔURA3</i>	TATATAAAATATGTCAACTATAAAACATAGTAGA GGGCTTGAATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
MK1 forward	Amplifizierung <i>der1ΔHis5⁺</i>	CAGAGATTTGTCACCAACAGAAGAAAAGCTAAA GCCCAAGCAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
MK2 reverse	Amplifizierung <i>der1ΔHis5⁺</i>	TTCACTTTTGTTATTGGTTTTTGGTAAATAAAAAC GGCCTTTCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
MK3 forward	Kontrolle <i>der1ΔHis5⁺</i>	AATTCTTCCGAAACAGCGTG	20mer; 55°C
MK4 reverse	Kontrolle <i>der1ΔHis5⁺</i>	CCTGTGCTTCGCATTGTTG	20mer; 56°C
SB145 forward	Amplifizierung <i>ubc2ΔURA3</i>	CCAAAGATTATTTTTAGGCAGACAGAGACTAAAA GATAAAGCGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
SB146 reverse	Amplifizierung <i>ubc2ΔURA3</i>	ATAATATCGGCTCGGCATTTCATCATTAAAGATTCT TTTGATTTTTCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
SB147 forward	Kontrolle <i>ubc2Δ</i>	TCGGAATATTAGTATGGTGACT	22mer; 52°C
SB148 reverse	Kontrolle <i>ubc2Δ</i>	GTCACTCTTCATTCTTGACG	20mer; 52°C
SB149 forward	Amplifizierung <i>ubc6ΔURA3</i>	CTAAAACCGCATTTCGCAAATTGCAAACAAAGTA CGTACAATAGTACAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
SB150 reverse	Amplifizierung <i>ubc6ΔURA3</i>	TCTGTGTTGTCAAATTTATCTAAAGTTTAGTTC ATTTAATGGCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C

SB151 forward	Kontrolle <i>ubc6Δ</i>	CTGGTCGCTTGAGTCGATATC	21mer; 56°C
SB152 reverse	Kontrolle <i>ubc6Δ</i>	CCTATATGGCTACACAACGTGC	22mer; 57°C
SB153 forward	Amplifizierung <i>ubc7ΔkanMX</i>	TAAAAGGAACTTCCCTAGTAATAGTGTAAATTTG GAAGGGCATAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
SB154 reverse	Amplifizierung <i>ubc7ΔkanMX</i>	ACAGTTAAAAGGAAGACCAAATGATCATTAAACCT GCTACCTGCTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
SB155 forward	Kontrolle <i>ubc7Δ</i>	GCTTGAAGAACTTACCAGACTG	22mer; 55°C
SB156 reverse	Kontrolle <i>ubc7Δ</i>	TGAGGTATGCATCCGATGG	19mer; 55°C
SB157 forward	Amplifizierung <i>ubx2ΔkanMX</i>	GTATTACGATAGAAGTATGTAATAGCTTTCATAG TGTAATCGAAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	64mer; 57°C
SB158 reverse	Amplifizierung <i>ubx2ΔkanMX</i>	AAACTCTTTGTACGCGTTTGTGCTTTTTAACGAT ATGCTATTTTAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	67mer; 58°C
SB159 forward	Kontrolle <i>ubx2Δ</i>	TACCGATACTATCACTTATACCGA	24mer; 54°C
SB160 reverse	Kontrolle <i>ubx2Δ</i>	ATAACTGTAACACCTGCATCC	21mer; 54°C
Leu-B	Kontrolle	AGTTATCCTTGGATTTGG	18mer; 52°C
Leu-C	Kontrolle	ATCTCATGGATGATATCC	18mer; 52°C

Tabelle 4.8: In dieser Arbeit verwendete Primer.

4.1.7 Computeranalysen

Literaturrecherchen wurden beim National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Als Informationsdatenbanken für Hefegene wurde die Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>) und Yeast Proteome Database (<https://www.proteome.com>) benutzt. Die Internetseiten (http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/) und (http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/Sherman_f/yeast/cont.html) informierten allgemein über Hefe. Für DNA-Sequenzanalysen (Restriktionsverdau und Plasmidkarten) wurde die Software ApE (A plasmid Editor (<http://wwwbiology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape>)) benutzt. Um Sequenzvergleiche (Alignments) zu erstellen wurde die Software CLC Free Workbench verwendet (<http://www.clcbio.com>). Für die Darstellung von Molekülstrukturen wurde die Software Py-MOL verwendet (<http://pymol.org/>). Zur Pufferbestimmung bei gleichzeitiger Verwendung von mehreren Restriktionsenzymen wurden die Dienste von (<http://fermentas.com/doubledigest/index.html>) und (<http://neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>) verwendet. Als Englisch-Deutsches Wörterbuch wurde LEO (<http://dict.leo.org/>) benutzt. Allgemeine Recherchen wurden bei (<http://www.google.de/>) und (<http://de.wikipedia.org>) durchgeführt.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Zellkultivierung

4.2.1.1 Medien

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* und *E. coli* Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Sambrook *et al.*, 1989; Guthrie und Fink, 1991; Ausubel *et al.*, 1992). Alle Medien wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Der gewünschte pH Wert wurde mit NaOH bzw. HCl eingestellt und die Medien wurden zur Sterilisation autoklaviert (20 min bei 121 °C). Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf Gewicht/Volumen (w/v). Zur Herstellung von Agarplatten enthielten die Medien 2 % Bacto™ Agar. Synthetische Vollmedien und Minimalmedien wurden je nach Bedarf der Stämme mit Aminosäuren und Nukleinbasen supplementiert.

Medium für Hefekulturen	Zusammensetzung
Vollmedium (YPD), pH 5,5	1% Hefeextrakt 2% Bacto® Pepton 2% D-Glukose
Synthetisches Vollmedium (SC), pH 5,6	0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids 2% D-Glukose je 0,0117 % L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin, L-Valin, myo-Inosit 0,00117 % p-Aminobenzoesäure Je nach Selektionsbedingungen wurden folgende Supplemente zugefügt: 0,3 mM L-Histidin 1,7 mM L-Leucin 1 mM L-Lysin 0,4 mM L-Tryptophan 0,3 mM Adenin 0,2 mM Uracil
Synthetisches Minimalmedium (MV), pH 5,5	0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids 2% D-Glukose 0,3 mM L-Histidin 1,7 mM L-Leucin 1 mM L-Lysin 0,4 mM L-Tryptophan 0,3 mM Adenin 0,2 mM Uracil
5-FOA-Medium	MV-Medium und zusätzlich 1mg/ml 5-Fluoro-orotsäure 0,4 mM Uracil
YPD-G418	YPD und zusätzlich 200 - 300mg/L Geneticin
„Labeling“-Medium, pH 6,0	0,17% Yeast Nitrogen Base w/o ammonium sulfate and w/o amino acids 0,1% D-Glukose 0,002% Adenin, Uracil, L-Tryptophan, L-Histidin

	0,003% <i>L</i> -Arginin, <i>L</i> -Tyrosin, <i>L</i> -Lysin, <i>L</i> -Leucin 0,005% <i>L</i> -Phenylalanin 0,01% <i>L</i> -Glutaminsäure, <i>L</i> - Asparaginsäure 0,015% <i>L</i> -Valin 0,02% <i>L</i> -Threonin 0,04% <i>L</i> -Serin
„Chase“-Medium, pH 6,0	“Labeling“-Medium und zusätzlich 0,6% <i>L</i> -Methionin 0,2% BSA

Tabelle 4.9: Verwendete Medien für Hefekulturen

Medien für Bakterienkulturen	Zusammensetzung
Vollmedium (LB), pH 7,5	1% <i>Bacto</i> [®] Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% Natriumchlorid
LB _{amp} -Medium	entspricht LB und enthält zusätzlich 75mg/L Ampicillin
SOC-Medium, pH 7,4	2% <i>Bacto</i> [®] Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,4% <i>D</i> -Glukose 10 mM Natriumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 2,5 mM Kaliumchlorid

Tabelle 4.10: Verwendete Medien für Bakterienkulturen

4.2.2 Wachstumsbedingungen für die Hefe *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Stämme ohne Plasmid wurden als Flüssigkultur in YPD-Medium oder auf YPD-Agarplatten bei 30 °C (wenn nicht anders angegeben) kultiviert. Die Gegenwart eines Plasmids wurde durch Wachstum in SC-Selektionsmedium oder auf SC-Agarplatten ohne Zugabe des benötigten Marker-Supplements sicher gestellt. Stämme auf Agarplatten wurden 2-3 Tage bei 30 °C im Wärmeschrank kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben angezogen, deren Gefäßvolumen dem fünffachen Flüssigkeitsvolumen entsprach. Die Inkubation erfolgte auf einem Rundschüttler bei 220 Upm (Umdrehungen pro Minute) und 30 °C (wenn nicht anders angegeben). Die Zelldichte der Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte von 1:10 (v/v) verdünnten Kulturen verfolgt (Extinktion bei 600 nm gegen das reine Medium als Referenz). Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht ca. einer Menge von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Die Hefestämme auf den Agarplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt und nach mehreren Wochen wieder neu ausgestrichen. Für Dauerkulturen mit Hefezellen wurde so viel Zellmaterial wie möglich von Agarplatten abgenommen und in 1 ml sterilem Glycerin mit einer Endkonzentration von 15 % (v/v) resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.3 Wachstumsbedingungen für *E. coli*

E. coli-Stämme wurden als Flüssigkultur in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C und 220 Upm über Nacht kultiviert. Als Selektionsmarker wurde Ampicillin in einer Konzentration von 75 µg/ml zugegeben. Dadurch können nur Klone wachsen, die ein Ampicillin-Resistenzgen auf einem Plasmid enthalten. Zur Selektion von ligierten Plasmiden kann dem LB-Medium 0,004% XGal und 0,04 mM IPTG zugegeben werden. Es erscheinen solche Kolonien blau, die Plasmide tragen, die kein Fragment in die Multiple Cloning Site (MCS) aufgenommen haben. Denn das für die β-Galaktosidase kodierende Gen *lacZ* liegt in der MCS. Wird nun ein Fragment dort eingefügt, wird das

Gen zerstört und die Expression von β -Galaktosidase unterbunden. Dadurch kann auch die Hydrolyse von XGal zu Galactose und einem blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff nicht stattfinden. Bei Bedarf kann das Wachstum der Zellen ebenfalls durch Messung der optischen Dichte (siehe Wachstumsbedingungen der Hefe) verfolgt werden. Für Dauerkulturen wurden 500 μ l Zellsuspension zu 500 μ l 60% (v/v) sterilem Glycerin (Endkonzentration von 30 % (v/v)) angelegt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung zur Lebend-Tot-Diskriminierung von *S. cerevisiae* Zellen

Lebende Zellen, die intakte Zellmembranen besitzen, sind für Farbstoffe wie Propidiumiodid (PI) undurchlässig. PI kann jedoch die perforierte Zellmembran von toten Zellen durchdringen und in DNA interkalieren (Levin *et al.*, 1995; Majno *et al.*, 1995). Das Eindringen von PI kann mit der Durchflusszytometrie gemessen werden. Für die Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen ist die kurze Zeit der Färbung mit PI bedeutsam, die zwischen wenigen Sekunden und maximal 10 min. liegt. Lebende Zellen hingegen nehmen einen kaum messbaren Anteil an PI auf (Jacobs *et al.*, 1983; Belloc *et al.*, 1994).

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACSCalibur der Firma BD Biosciences. Da die Messung durch ein Zwischenprodukt, das durch eine Mutation im *ade2* Gen hervorgerufen wird, gestört werden kann, wurde dem SC-Medium 3fach Adenin zugegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei 25 °C angezogen. Es wurden 5 OD₆₀₀ Zellen geerntet und erneut in SC-Medium mit 3fach Adenin resuspendiert. Es wurden 20 μ M Methotrexat hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 0,5 OD₆₀₀ Zellen geerntet und eine Minute bei V_{max} pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS Cellwash (BD Biosciences) gewaschen und nochmals für 1 min bei V_{max} zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 1 ml PBS Cellwash (BD Biosciences) resuspendiert und kurz gevortext. Anschließend wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Produktnummer: 352235) überführt, das 5 μ g PI enthielt und nochmals kurz gevortext, bevor die durchflusszytometrische Analyse begann.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Konstruktion von Hefestämmen

Die Deletion der Gene *HRD3*, *DER1*, *PRC1*, *UBR1*, *DOA10* und *DER3/HRD1* erfolgte nach der Methode von Güldener *et al.* (1996).

Von den Plasmiden pUG6, pUG27 und pUG72 wurden mit den entsprechenden Primern die Marker-Kassetten amplifiziert.

Dabei entstehen ein 1,7 kb großes DNA-Fragment, das eine *KAN^R*-Kassette enthält, oder eine 1,55 kb große *His5⁺*-Kassette, sowie ein 1,7 kb großes Amplifikat, das die *URA3*-Kassette enthält.

Die PCR-Produkte werden anschließend in die Stämme mit dem gewünschten genetischen Hintergrund transformiert. Es wird je nach Marker selektioniert. Die korrekte Integration der Deletionskassetten wird mittels Kontroll-PCRs überprüft.

Für den Stamm YWO 1652 wurden die Primer SB76 und SB78 verwendet. Das Amplifikat wurde dann in den Stamm YWO 0636 transformiert. Die richtige Integration wurde mit den Oligonukleotiden SB60, SB62, TEF Promotor und TEF Terminator ermittelt.

Die Oligonukleotide MK1 und MK2 wurden für die Herstellung des Stammes YWO 1730 benutzt. Das PCR-Produkt wurde in den Stamm YWO 0636 transformiert. Um die korrekte Integration zu überprüfen, wurde mit den Primern MK3, MK4, TEF Promotor und TEF Terminator eine Kontroll-PCR durchgeführt.

Der Stamm YFE 17 wurde mit dem PCR-Produkt transformiert, das mit den Oligonukleotiden SB85 und SB86 erhalten wurde. Der neue Stamm YWO 1711 wurde mit Hilfe der Primer SB87, SB88, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft.

Der Stamm YWO 1719 entstand durch Transformation des Amplifikats, das mit den Oligonukleotiden SB85 und SB86 erhalten wurde, in den Stamm YPD 5. Zur Kontrolle wurde mit Hilfe der Primer SB87, SB88, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft.

Die Stämme YJMR2 und YRH 023 wurden mit dem *CRE*-Expressionsplasmid pSH47 transformiert, um den *kanMX*-Marker zu entfernen. Anschließend wurden sie mit dem PCR-Produkt transformiert, das mit den Oligonukleotiden SB85 und SB86 erhalten wurde. Die erhaltenen Stämme YWO 1720 und YWO 1721 wurden mit Hilfe der Primer SB87, SB88, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft.

Der Stamm YWO 1708 wurde aus der Kreuzung von YWO 1580 und YWO 1312 mit nachfolgender Sporulation und Tetradendisektion gewonnen. Die erhaltenen Sporen wurden auf Leucinprototrophie und Geneticinresistenz geprüft. Per Kontroll-PCR wurde der neue Stamm YWO 1708 und den Oligonukleotiden SB91, SB92, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft. Dieser Stamm wurde anschließend auch mittels Southernblot durch S. Laure kontrolliert.

Als Ausgangsstamm für die Herstellung weiterer Stämme diente YWO 1733. Der Stamm YWO 1528 wurde mit dem *CRE*-Expressionsplasmid pSH47 transformiert, um den *kanMX*-Marker zu entfernen.

Der Stamm YWO 1744 entstand durch Transformation des PCR-Produkts, das mit den Oligonukleotiden MK1 und MK2 amplifiziert wurde, in den Stamm YWO 1527. Um die korrekte Integration zu überprüfen, wurde mit den Primern MK3, MK4, Leu-B und Leu-C eine Kontroll-PCR durchgeführt.

Durch Transformation des PCR-Produkts, das mit den Oligonukleotiden MK1 und MK2 amplifiziert wurde, in den Ausgangsstamm YWO 1648, entstand der neue Stamm YWO 1746. Die korrekte Integration wurde mittels einer Kontroll-PCR mit den Primern MK3, MK4, Leu-B und Leu-C überprüft.

Für die Herstellung des Stammes YWO 1803 diente YWO 1711 als Ausgangsstamm. Diesem wurde das Amplifikat, das durch die Primer SB137 und SB138 generiert wurde, transformiert. Daraus entstand YWO 1801. Durch Transformation des PCR-Produkts, das mit den Oligonukleotiden P130 und P131 amplifiziert wurde, in den Stamm YWO 1801, entstand der neue Stamm YWO 1803. Die Deletion des *DER3/HRD1* Gens wurde mit den Oligonukleotiden SB128, DER3fwd, Leu-B und Leu-C überprüft. Die Deletion des *DOA10* Gens wurde dagegen mit den Oligonukleotiden SB129, SB130, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft.

Zur Herstellung des Stammes YWO 1812 diente als Ausgangsstamm YWO 1733. Die Deletionskassette wurde mit den Primern SB145 und SB146 amplifiziert und in den Stamm YWO 1733 transformiert. Die korrekte Integration wurde mit den Primern SB147, SB148, Ura-C und Ura-B kontrolliert. Der hieraus entstandene Stamm wird YWO 1806 bezeichnet. Der Stamm YWO 1806 wurde mit dem *CRE*-Expressionsplasmid pSH63 transformiert, um den *URA3*-Marker zu entfernen, und somit den Stamm YWO 1812 zu erhalten.

Der Stamm YWO 1814 entstand durch die Transformation des Amplifikats, das durch die Primer SB157 und SB158 erhalten wurde, in den Ausgangsstamm YWO 1733. Mittels Kontroll-PCR und den Oligonukleotiden SB159, SB 160, TEF Promotor und TEF Terminator wurde die korrekte Integration der Deletionskassette überprüft.

Für die Herstellung des Stammes YWO 1817 diente als Ausgangsstamm YWO 1733. Durch Transformation der Deletionskassette, die mit den Primern SB149 und SB150 amplifiziert wurde, in den Stamm YWO 1733 entstand YWO 1810. YWO 1810 wurde per PCR mit den Primern SB151, SB152, Ura-C und Ura-B kontrolliert. Um den *URA3*-Marker zu entfernen wurde das *CRE*-Expressionsplasmid pSH63 transformiert. Der daraus entstandene Stamm YWO 1820 wurde mit der Deletionskassette, die mit den Oligonukleotiden SB153 und SB154 amplifiziert wurde, transformiert. Der gewonnene neue Stamm YWO 1817 wurde anschließend mittels Kontroll-PCR mit den Primern SB155, SB156, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft.

Für den Stamm YWO 1735 wurden die Primer FPubr1dis und RPubr1dis verwendet. Das Amplifikat wurde in den Stamm YWO 1527 transformiert. Die richtige Integration wurde mit den Oligonukleotiden Ura-C, Ura-B, Ubr1-A und Ubr1-D überprüft.

Der Stamm YWO 1706 entstand durch die Transformation des Amplifikats, das durch die Primer SB9 und SB10 erhalten wurde. Mit den Oligonukleotiden SB11, SB12, TEF Promotor und TEF Terminator wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Anschließend wurde das *CRE*-Expressionsplasmid pSH47 transformiert, um den *His5⁺*-Marker zu entfernen. Danach wurde mit Hilfe einer Deletionskassette, die mit den Primern SB37 und SB38 amplifiziert wurde, das *SSA2* Gen im Stamm YWO 1702 deletiert. Der neue Stamm YWO 1696 wurde mit den Oligonukleotiden SB22, SB23, TEF Promotor und TEF Terminator kontrolliert. Das *CRE*-exprimierende Plasmid wurde in den Stamm YWO 1696 transformiert, um die Kanamycin-Kassette zu entfernen. Es entstand der Stamm YWO 1707. Nun wurde der Stamm YWO 1707 mit der Deletionskassette, die mit den Primern SB30 und SB93 amplifiziert wurde, transformiert, sodass das *SSA3* Gen nur teilweise deletiert wurde. Daraus entstand der Stamm YWO 1590, der mit den Oligonukleotiden SB49, SB50, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft wurde.

Der Stamm YWO 1710 wurde durch einen pop-in-pop-out mit dem Ajil verdauten Plasmid PWO 1025, das in den Stamm YWO 1590 transformiert wurde, hergestellt. Dieser Stamm wurde mittels Southernblot kontrolliert. Bei der Southernblot Analyse wurden Sonden gegen den *His5⁺*-Marker, den Promotorbereich des *ssa2ΔloxP* und des *ssa4ΔloxP* Gens eingesetzt, die mit den Primern SB 98, SB99, SB100, SB101, SB102 und SB103 amplifiziert wurden.

Der Stamm YWO 1740 entstand durch Transformation einer Deletionskassette, die mit den Primern SB137 und SB138 amplifiziert wurde, in den Stamm YWO 1336. Die Deletion des *DER3/HRD1* Gens wurde mit den Oligonukleotiden SB128, DER3fwd, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft. Anschließend wurde eine mit den Primern P 130 und P 131 amplifizierte Deletionskassette in den Stamm YWO 1740 transformiert. Hieraus entstand der Stamm YWO 1741. Die korrekte Integration wurde mit den Oligonukleotiden SB129, SB130, TEF Promotor und TEF Terminator überprüft.

Die Vierfachmutante YWO 1731 wurde aus der Kreuzung von YWO 1528 und YFE 2 mit nachfolgender Sporulation und Tetradendisektion gewonnen. Die erhaltenen Sporen wurden auf Histidin- und Leucinprototrophie sowie Geneticinresistenz geprüft. Die Deletionsmutante wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden, Ubr1-A, Ubr1-D, TEF Promotor und TEF Terminator verifiziert.

4.3.1.1 Sporulation und Tetradendisektion

Zunächst werden auf einer YPD Platte gleich große Mengen der beiden haploiden Stämme von unterschiedlichem Paarungstyp gemischt. Daraufhin wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Um Sporen zu erhalten wurde der diploide Stamm auf einer Sporulationsplatte inkubiert. Da nur im W303 Hintergrund gearbeitet wurde und dieser Stammhintergrund leicht sporuliert, wurde nicht auf Präsporulationsplatten inkubiert. Nach ca. drei Tagen wurde mikroskopisch nach Tetraden gesucht. Im Falle von genügend gesichteten Sporen wurde eine Stecknadelkopf große Menge zur Lyse der Ascuswände in

200 µl Sorbitol-Puffer und 3 µl Oxalyticase (1 mg/ml $\hat{=}$ 2500 U/ml) gegeben. Es wurde vorsichtig gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml ddH₂O zugegeben und 2 bis 3 Stunden auf Eis inkubiert. Davon wurden 12 µl auf eine ebene YPD -Platte aufgetragen und 15 min getrocknet. Mit einem Tetraden-Mikromanipulator wurden die Tetraden getrennt. Inkubiert bei 30°C wuchsen die vereinzelt Zellen nach 3 Tagen zu erkennbarer Größe heran und konnten anschließend analysiert werden.

Sorbitol-Puffer

4 M Sorbitol

1 M Tris/HCl pH7,5

4.3.2 Konstruktion von Plasmiden

Für die Herstellung des Plasmids PWO 1195 wurde zuerst der Promotor Bereich des *PRC1* Gens mit dem Oligonukleotidpaar SB66 und SB67 amplifiziert. Anschließend wurde mit den Primern SB70 und SB71 der Terminator Bereich des *PRC1* Gens vervielfältigt. Für beide Amplifikationen wurde genomische DNA des Stammes YWO 342 als Template verwendet. Nun wurde der Vektor pRS316 und der amplifizierte Promotor mit den Restriktionsenzymen NotI und Sall geschnitten. Nach korrekter Ligation wurde das Plasmid pSB-P_{*PRC1*} sowie der amplifizierte Terminator mit den Restriktionsenzymen Sall und KpnI geschnitten. Nach erfolgreicher Ligation entstand das Plasmid pSB-PT_{*PRC1*}, welches mit Hilfe von verschiedenen Restriktionsenzymen überprüft wurde.

Für die Konstruktion des Plasmids PWO 1197 wurde zunächst mit den Primern SB68 und SB69 die Sequenz für das Substrat CTD* vom Plasmid PWO 1017 amplifiziert. Dann wurde das Plasmid PWO 1195 und das Amplifikat mit den Restriktionsenzymen SpeI und Sall geschnitten. Die korrekte Ligation wurde anhand verschiedener Restriktionsenzymen kontrolliert.

Zur Herstellung des Plasmides PWO 1202 wurde die Fähigkeit der Hefe zur homologen Rekombination in Kombination mit der Methode von Longtine genutzt (Longtine et al., 1998). Als Grundlage für die Klonierung des Plasmides diente das Plasmid PWO 1197, welches mit der Restriktionsendonuklease Sall linearisiert wurde. Des Weiteren wurde vom Plasmid pFA-13Myc-kanMX6 mit dem Oligonukleotidpaar SB106 und SB107 ein 2,3 kb großes, *KAN^R* enthaltendes DNA-Fragment amplifiziert, welches für die C-terminale 13xMyc Markierung von Proteinen verwendet werden kann. Das linearisierte Plasmid, sowie das 13Myc-DNA-Fragment wurden im Verhältnis 2:1 in den Stamm YWO 0636 transformiert. Aus Einzelkolonien, die zugleich eine Geneticinresistenz und Uracilprototrophie aufzeigten, wurde durch „plasmid rescue“ das enthaltene Plasmid isoliert und anschließend zur Amplifikation in *E. coli* transformiert. Durch den Verdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und Expressionskontrollen im Stamm YWO 1526 wurde das Plasmid und die Funktionalität der 13xMyc-Markierung nachgewiesen.

Für die Klonierung des Plasmids PWO 1025 wurde zunächst mit den Oligonukleotiden SB25 und SB26 ein 3,2 kb großes Fragment von genomischer DNA des Stammes YWO 635 amplifiziert. Für die PCR wurde zunächst PhusionTM-Polymerase verwendet. Zum Abschluß der PCR wurde für 15 Minuten bei 72 °C Taq-Polymerase zugegeben, um einen AAA-Überhang zu generieren. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Vektor subkloniert. Der entstandene pGEM[®]-T-*ssa1-45^{ts}* Vektor wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI präparativ verdaut. Zusätzlich wurde mit PvuI geschnitten, damit der Backbone nochmals geteilt wird, und sich so vom gesuchten Fragment unterscheidet. Gleichzeitig wurde der Vektor pRS306 mit NotI geschnitten und mit Alkaline shrimp Phosphatase dephosphoryliert. Anschliessend erfolgte die Ligation der *ssa1-45^{ts}*-Sequenz in den pRS306 Vektor.

4.3.3 Isolierung chromosomaler DNA

Die Zellen einer 2 ml YPD-Übernachtskultur wurden geerntet (30 sec, 11000 x g), mit 1 ml destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen und in ein Safe-lock®-Reaktionsgefäß überführt. Zu diesen Zellen wurden 200 µl Aufschlußpuffer, 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) und 200 µl Glasperlen (Ø 0,40-0,60mm) gegeben. Die Zellen wurden 10 min auf einem Multivortexer bei 4 °C aufgeschlossen und anschließend wurden 200 µl ddH₂O dazugegeben. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt (10 min, 11000 x g, 4 °C). Ungefähr 300 µl der wässrigen Phase wurde abgenommen, mit 1 ml kaltem 100 %igen Ethanol versetzt und 30 min bei -80 °C gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min bei 11000 x g und 4 °C wurde das DNA-Pellet in 400 µl ddH₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl einer RNase-Lösung (10 mg/ml) wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl 5 M Ammoniumacetat-Lösung und 1 ml kalter 100 %iger Ethanol zugegeben. Nach dem Fällen (30 min bei -80 °C) wurde zentrifugiert (10 min, 11000 x g, 4 °C), das Pellet mit 1 ml kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, bei 65 °C getrocknet und in 25 µl ddH₂O aufgenommen.

Aufschlußpuffer

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

4.3.4 Southernblot Analyse

Chromosomale DNA (30 µg) wurde in einem 20 µl Standardansatz mit geeigneten Restriktionsenzymen (20 Units) über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Proben wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, und anschließend wurde die DNA auf eine Hybond™-N+ Membran transferiert. Dafür wurde das Agarose-Gel jeweils 10 min mit Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer behandelt. Danach wurde das Gel mit 20x SSC-Puffer überschichtet und die DNA dann über einen Zeitraum von 1 h mittels angelegtem Vakuum auf die Nylonmembran übertragen. Alle 15 min wurde 20x SSC-Puffer nachgelegt. Danach wurde die DNA durch fünfminütiges Bestrahlen mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Präparation der Sonde sowie die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Amersham, AlkPhos Direct™ Labeling and Detections Systems). Die Sonde wurde aus einem PCR-Fragment, homolog zur chromosomal integrierten DNA, hergestellt. Für die Sonde wurden 100 ng DNA eingesetzt.

Denaturierungspuffer	Neutralisierungspuffer	20x SSC-Puffer
1,5 M NaCl	0,5 M Tris/HCl pH 7,0	3,0 M NaCl
0,5 M NaOH	3,0 M NaCl	0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

4.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen („plasmid rescue“)

(nach Robzyk und Kassir, 1992)

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus Hefezellen wurden 1,5 ml einer unter Selektivbedingungen bis zur Sättigung gewachsenen Übernachtskultur durch Zentrifugation bei V_{max} für 1 min in einem 2 ml Safe-lock®-Reaktionsgefäß geerntet. Die Zellen wurden in 100 µl STET Puffer resuspendiert. Es wurden 200 µl Glasperlen dazugegeben und anschließend wurden die Zellen auf einem Disruptor 5 min bei 4 °C aufgeschlossen. Danach wurden nochmals 100 µl STET Puffer hinzugegeben, kurz gemischt und für 3 min bei 95 °C inkubiert. Es wurde auf Eis abgekühlt und 10 min, V_{max} bei 4 °C zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, in dem 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat vorgelegt waren. Es wurde 1 h bis über Nacht bei -20 °C gefällt. Um Verunreinigungen zu entfernen, die die Transformation von

E. coli stören könnten, wurde bei V_{\max} , 10 min und 4 °C zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, in dem 200 µl 100% eiskalter Ethanol vorgelegt waren. Es wurde bei V_{\max} , 10 min und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und wie zuvor pelletiert. Das Pellet wurde kurz bei 65 °C getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

STET Puffer (500 ml)

8% Saccharose (w/v) in 300 ml H₂O lösen
 20% Triton X 100 (v/v)
 0,025 M EDTA pH 8,0
 0,05 M Tris HCl pH 8,0

4.3.6 Zelltransformationenen

4.3.6.1 Transformation von Plasmid-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

(nach Gietz *et al.*, 2002)

10 ml einer Übernachtskultur in YPD wurde beim Erreichen der stationären Phase in 50 ml YPD Hauptkultur und einer OD₆₀₀ von 0,2 umgeimpft. 35 OD₆₀₀ Zellen wurden nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 geerntet (1 min, 4400 xg). Die Zellen wurden mit 20 ml ddH₂O gewaschen (1 min, 4400 xg) und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Es wurde erneut bei V_{\max} 10 sec zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl 100 mM LiAc aufgenommen und in 50 µl Zellsuspensionseinheiten aufgeteilt. Anschließend wurde wieder bei V_{\max} 10 sec zentrifugiert. Nun wurde zu jedem Transformationsansatz je 240 µl 40 % PEG, 36 µl 1 M LiAc, 50 µl ssDNA (vorher 5 min bei 95 °C aufgeköcht und auf Eis abgekühlt) zugegeben. Je nach Konzentration der Plasmid-DNA wurden bis zu 34 µl zum Ansatz dazugegeben. Der Rest wurde auf ein Gesamtvolumen von 360 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Transformationsansätze wurden gut gevortext. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 20 min bei 42 °C. Danach wurden die Ansätze vorsichtig bei 3200 xg 30 sec zentrifugiert und in 1 ml ddH₂O aufgenommen. Die Transformationsansätze wurden in einem Verhältnis von 1:10 auf Selektionsplatten mit großen Glasperlen (Ø 5mm) ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C (bei temp eratursensitiven Stämmen bei 25 °C) inkubiert.

4.3.6.2 Transformation von Deletions- oder Integrationskassetten in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von Deletions- oder Integrationskassetten wurde leicht verändert nach Güldener *et al.* (1996) und Gietz *et al.* durchgeführt.

Die Zellen wurden wie im Abschnitt 2.3.5.1 beschrieben behandelt. Jedoch wurden bis zu 10 µg DNA transformiert. Nachdem die Transformationsansätze gevortext wurden, erhielten sie eine halbstündige Ruhephase bei 30 °C. Erst dann erfolgte der Hitzeschock. Bei einigen Deletions- oder Integrationskassetten wurde den Zellen nach dem Hitzeschock nochmals eine zweistündige Ruhephase bei 30°C in 3 ml YPD gegönnt.

4.3.6.3 Elektrotransformation von *Escherichia coli* Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 40 µl Zellsuspension wurde mit 1-3 µl DNA (DNA einer Ligation oder Plasmid-DNA) versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine kalte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektrotransformation wurde mit Hilfe des *Gene Pulser*[®] (BioRad) durchgeführt. Es wurden folgende Geräteeinstellungen gewählt: 25 µF, 200 W und 2,5 V. Danach wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellsuspension wurde in einem Reaktionsgefäß 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wurde 20 sec bei 1600 xg zentrifugiert, die Zellen wurden in 50 µl Wasser resuspendiert und auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Um die Ausbeute der Transformation zu erhöhen, wurde die DNA vor der Transformation entsalzt. Auf eine Nitrocellulosemembran

in einer Petrischale mit ddH₂O wurden 1 - 5 µl DNA gegeben. Nach 30 min wurde die Dialyse beendet und die DNA wurde transformiert.

4.3.6.4 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Aliquots mit kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden 100 µl *E. coli*s mit 10 µl DNA eines Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C, 90 sec. Sofort wurde der Transformationsansatz 1 min auf Eis gekühlt. Es wurde 1 ml steriles SOC-Medium dazugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 600 xg, 30 sec. Es wurden 900 µl Überstand abgenommen, das Pellet wurde im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

4.3.7 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen

4.3.7.1 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen für Elektroporation

E. coli Zellen wurden in 20 ml LB-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 1 l LB-Medium (Verdünnung 1:100) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 herangezogen. Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 15-30 min auf Eis gestellt und dann 10 min bei 3350 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 l ddH₂O, dann 500 ml ddH₂O und abschließend mit 20 ml 10 % Glycerin (v/v) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 2-3 ml 10 %igem Glycerin (v/v) resuspendiert. Es wurden Aliquots à 40 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.3.7.2 Herstellung von kompetenten *Escherichia coli* Zellen für Hitzeschock-Transformation (nach Inoue *et al.*, 1990)

E. coli Zellen wurden in 20 ml LB-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zellen wurden in 250 ml SOB überimpft und bei 18 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 wachsen gelassen. Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt und bei 2500x g, 10 min und 4 °C geerntet. Die Pellets wurden in 50 ml kaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nochmal bei 2500x g, 10 min und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden nun in 20 ml kaltem TB-Puffer resuspendiert. Es wurde 7% DMSO dazugegeben. Die Zellen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden bei -80 °C gelagert. Der benötigte TB-Puffer wurde bis zur Verwendung bei 10 °C aufbewahrt.

TB-Puffer	SOB	50x SOC
10 mM PIPES	2% Tryptone	1 M Glucose
55 mM MnCl ₂	0,5% Yeast Extract	0,5 M MgCl ₂
15 mM CaCl ₂	10 mM NaCl	0,5 M MgSO ₄
250 mM KCl	2,5 mM KCl	
alles mischen außer MnCl ₂ ,	autoklavieren, danach	
mit KOH auf pH=6,7 titrieren,	20 ml 50x SOC zugeben	
MnCl ₂ zugeben und sterilfiltrieren		

4.3.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung beliebiger DNA-Fragmente. Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab. Für die Extension eines 1 kb langen Fragments mit der Taq-Polymerase wird eine Dauer von 1 min berechnet, während bei der Phusion®-Polymerase eine Zeitdauer von 30 sec angesetzt wird. Die Taq-Polymerase wurde bei Kontroll-PCRs eingesetzt, während die Phusion®-Polymerase wegen ihrer Korrekturlese-Aktivität für die Amplifizierung von Integrationskassetten und beim Klonieren verwendet wurde. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide wurde je Reaktion 2 °C unter der

niedrigsten Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Die Schmelztemperatur wurde wie folgt berechnet: $T_m = 4 * (G+C) + 2 * (A+T)$

4.3.8.1 Standard Kontroll-PCR

Ein 50 µl-Standardansatz enthielt:

1 µl genomische DNA als Template
 5 µl 10x Puffer E mit 25 mM MgCl₂
 1 µl 10 mM dNTPs
 1 µl sense Primer (100 pmol/µl)
 1 µl antisense Primer (100 pmol/µl)
 0,5 µl Taq-Polymerase
 40,5 µl ddH₂O

Standard-Programm:

95 °C - 3 min
 95 °C - 1 min
 T_{an} - 1 min
 72 °C - t_{an}
 72 °C - 10 min
 4 °C - ∞

} 29x

4.3.8.2 Phusion®-PCR

Ein 50 µl-Ansatz beinhaltete:

1 µl DNA-Template
 10 µl 5x Puffer mit 7,5 mM MgCl₂
 1 µl 10 mM dNTPs
 1 µl sense Primer (10 pmol/µl)
 1 µl antisense Primer (10 pmol/µl)
 0,3 µl Phusion®-Polymerase
 35,7 µl ddH₂O

Phusion-Programm:

98 °C - 2 min
 98 °C - 10 sec
 T_{an} - 40 sec
 72 °C - t_{an}
 72 °C - 10 min
 4 °C - ∞

} 29x

4.3.8.3 Kolonie-PCR

Zur schnellen Überprüfung einzelner Hefekolonien auf Deletionen wurde die Kolonie-PCR angewandt.

Um die Zellen aufzuschließen, wurde zunächst eine geringe Zellmenge in 30 µl 20 mM NaOH resuspendiert, bei 95 °C, 10 min inkubiert und 1 min bei V_{max} abzentrifugiert. Zu 24 µl Mastermix wurde 1 µl des Überstandes mit der enthaltenden DNA zugegeben.

Mastermix (für 10 Ansätze)

0,5 µl sense Primer (100 pmol/µl)
 0,5 µl antisense Primer (100 pmol/µl)
 5 µl 10 mM dNTPs
 25 µl 10x Puffer E mit 25 mM MgCl₂
 10 µl 25 mM MgCl₂
 2,5 µl Taq-Polymerase
 206,5 µl ddH₂O

Standard-Programm:
 siehe 2.3.7.1

4.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese wurde in einer Flachbett-Elektrophoresekammer mit 1 %igen (w/v) Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid (1:10.000) in TAE-Puffer durchgeführt. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Die Fragmente wurden bei 120 V aufgetrennt. Als Längenstandard diente 1 kb DNA-Leiter. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mit dem Dokumentationssystem der Firma MWG Biotech unter UV-Licht (302 nm) dokumentiert. DNA, mit der weiter gearbeitet werden sollte, wurde nur mit einer Handlampe belichtet.

TAE Puffer

6x DNA-Probenpuffer

40 mM Tris/HOAc, pH 7,0 30 % Glycerin (v/v) in TAE
1 mM EDTA pH 8,0 0,25 % Bromphenolblau

4.3.10 Restriktionsverdau

Standardmäßig wurden 1 µl Plasmid-DNA, 10x Inkubationspuffer und nie mehr als 5% der Endonuklease in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Es wurde 2 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert (meistens bei 37 °C). Bei präperativen Verdaus wurde 16 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Doppelverdau wurden bei den für beide Restriktionsenzyme optimalen Pufferbedingungen durchgeführt.

4.3.11 Ligation

In einem 10 µl Standardansatz wurden geschnittenes Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Nach Zugabe von 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz bei Raumtemperatur 2 h inkubiert. Bei schwierigen Ligationsansätzen wurde auch über Nacht bei 18 °C inkubiert. Die DNA wurde dann in *E. coli*-Zellen transformiert.

4.3.12 DNA-Sequenzierung

Aus einer *E. coli*-Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA mittels Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit nach Firmenvorschrift in hoher Reinheit isoliert. Der Waschschrift wurde dazu 2x mehr wiederholt als vorgegeben. Die eluierte DNA wurde zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech geschickt, welche auch die benötigten Primer synthetisierte oder es wurden Primer in der Konzentration 10 pmol/µl mitgeschickt.

4.3.13 Easy Plasmid Miniprep

(nach Berghammer H. and Auer B., 1993)

Es wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur bei V_{max} für 1 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 µl Easy Prep Puffer unter Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 2 min inkubiert und sofort für 1 min auf Eis abgekühlt. Es folgte ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 13 000 xg. Der Überstand wurde weiter verarbeitet.

Easy Prep Puffer (bei -20 °C auf bewahren)

10 mM Tris/HCl pH8
1 mM EDTA
15 % Saccharose (w/v)
2 mg ml⁻¹ Lysozym
0,2 mg ml⁻¹ RNase A
0,1 mg ml⁻¹ BSA

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Alkalische Lyse

Die alkalische Lyse ist ein denaturierender Zellaufschluss. Die Zellen wurden bis zur gewünschten OD_{600} angezogen, und ein Volumen von 10 OD_{600} Zellen wurden geerntet. Danach wurde 1 min bei 11000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150 μ l Lyse-Lösung erfolgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Zum Präzipitieren der Proteine wurde anschließend 150 μ l 50% ige TCA (w/v) zugesetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 11000 x g zentrifugiert, danach wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 500 μ l kaltem Aceton gewaschen, getrocknet und durch eine Inkubation von 10 min bei 42 °C unter Schütteln in 50 μ l Harnstoffprobenpuffer gelöst.

Lyse-Lösung

1,85 M NaOH

7,5 % β -Mercaptoethanol

Harnstoffprobenpuffer

200 mM Tris/HCl pH 6,8

8 M Harnstoff

0,1 M EDTA

5 % SDS (w/v)

0,05 % Bromphenolblau (w/v)

1 % β -Mercaptoethanol (v/v) immer frisch zugeben!

4.4.2 Gesamtproteinextraktion

Bei der Proteinextraktion werden die Zellen mechanisch mit Glasperlen (\varnothing 0,40-0,60 mm) aufgeschlossen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und in vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase wachsen gelassen und es wurden anschließend 10 OD_{600} Zellen geerntet. Es wurde einmal bei V_{max} , 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Milliliter $TE_{25/5}$ - Puffer gewaschen und wieder pelletiert. Dem Pellet wurden ungefähr 50 μ l Glasperlen (\varnothing 0,40-0,60mm), 100 μ l Harnstoffprobenpuffer und 1 μ l 1 M PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte 10 min lang auf einem Disruptor im Kühlraum. Anschließend wurde nochmals 1 μ l 1 M PMSF hinzugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Es wurde 1 min bei V_{max} zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

$TE_{25/5}$ -Puffer

25 mM Tris/HCl pH 7,5

5 mM EDTA

4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in SDS-Laufpuffer durchgeführt (Lämmli, 1970). Es wurden hauptsächlich 7,5 %ige und 10 %ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Pro Bahn wurden 10-20 μ l Proteinlösung in Harnstoff- Puffer aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 150 V.

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris

200 mM Glycin

1 % SDS (w/v)

Komponenten	7,5 % Trenngel	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
ddH ₂ O	4,85 ml	4,02 ml	3,05 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	50 µl
30 % Acrylamid	2,5 ml	3,3 ml	650 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 4.11: Komponenten der Gele für die SDS-PAGE

4.4.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine werden aus einem Polyacrylamidgel mittels einer angelegten elektrischen Spannung nun auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, fixiert und dann immunologisch detektiert. Der Sandwich-Blot beinhaltet einige Lagen Filterpapier, SDS-Gel, Nitrocellulosemembran und nochmals einige Lagen Filterpapier. Der Blot wurde mit Transfer-Puffer überschichtet, der mit Eis über die Dauer des Transfers gekühlt wird. Der Transfer wurde bei 360 mA 30 - 45 min durchgeführt.

Transfer-Puffer

25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,02 % SDS (w/v)
 20 % MeOH (v/v)

4.4.5 PonceauS-Färbung

Um die Qualität des Transfers von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen zu überprüfen, wurden die Membranen nach dem Western Blot mit PonceauS-Lösung versetzt und einige Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgeschüttet und die Membranen solange mit deionisiertem Wasser gewaschen, bis diskrete Proteinbanden sichtbar wurden.

PonceauS-Lösung

0,2 % PonceauS (w/v)
 1 % Essigsäure (v/v)

4.4.6 Immunologische Detektion

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran zunächst mit 5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer über Nacht oder eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler geblockt. Danach wurde die Membran mit einem Primärantikörper eine Stunde bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 10 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Dann erfolgt die Inkubation mit einem HRPO-markiertem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran nochmals dreimal 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Auf die Nitrocellulosemembran wurde 1 ml ECL-Lösung aufgetragen und im Anschluß ein lichtempfindlicher Film aufgelegt und entwickelt.

TBS-T-Puffer

137 mM NaCl
 0,1 % Tween-20 (v/v)
 20 mM Tris/HCl pH 7,6

4.4.7 Cycloheximid Chase Analyse

Um den Abbau von Proteinen qualitativ zu verfolgen, wurden logarithmisch, in synthetischem Minimalmedium wachsende Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bis 1,5 OD₆₀₀ herangezogen und 10 OD₆₀₀ Zellen geerntet. Die Zellen wurden in 2,5 ml des jeweiligen synthetischen Minimalmediums resuspendiert und mit 0,75 mg ml⁻¹ Cycloheximid (CHX) versetzt, wodurch die Proteinbiosynthese gestoppt wurde. Sofort wurden 2,5 OD₆₀₀ Zellen pro Zeitpunkt entnommen und auf Eis aufbewahrt oder bei -80°C weggefroren, wenn die Proteinextraktion nicht mehr am selben Tag erfolgte. Abhängig vom zu untersuchenden Protein wurde entweder die Alkalische Lyse oder die Gesamtproteinextraktion als Aufschluß gewählt. Die anschließende Auftrennung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE gefolgt von Westernblot und Analyse durch Immundetektion. Bei temperatursensitiven Stämmen wurden die Zellen vor Zugabe des CHXs eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler bei 220 Upm inkubiert. Im Fall des Substrats CTD* wurden 20 µM Methotrexat (MTX) 30 min vor Zugabe des CHXs hinzugefügt.

4.4.8 Pulse Chase Experiment

Zur Erstellung einer quantitativen Abbaukinetik von Proteinen wurden logarithmisch, in synthetischem Minimalmedium wachsende Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bis 1,5 OD₆₀₀ herangezogen und 10 OD₆₀₀ Zellen geerntet. Es wurde dreimal mit „Labeling“-Medium gewaschen und anschließend in 1 ml „Labeling“ Medium resuspendiert und für 50 min unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Bei Temperatursensitiven Stämmen wurde bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µCi ³⁵S-Methionin (10 µCi/µl) pro 1 OD₆₀₀ Zelleinheit wurden die Zellen schüttelnd bei 30 °C (bei temperatursensitiven Stämmen bei 37 °C) für 30 min markiert. Im Fall von CTD* wurde zeitgleich 20 µM Methotrexat zugegeben. Danach wurde der Einbau des radioaktiven ³⁵S-Methionin durch Hinzufügen von 1 ml „Chase“-Medium gestoppt. Zeitgleich wurden 2,5 OD₆₀₀ Zellen pro Zeitpunkt als Zeitprobe entnommen und zu 50 µl vorgelegter eiskalter 110 %iger Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Die Zeitproben wurden bei -80 °C weggefroren oder gleich einer Zelllyse unterzogen. Nach Auftauen der Proben wurden diese bei 11 000 xg, 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden mit eiskaltem Aceton unter Schütteln auf einem Multivortexer gewaschen und erneut bei 11 000 xg für 3 min zentrifugiert. Die Pellets wurden 30 sec bei 60 °C in einem Heizblock getrocknet. Unter Zugabe von 100 µl Glasperlen (Ø 0,40-0,60mm) in 100 µl BB1 Aufschlußpuffer erfolgte die Zelllyse abwechselnd schüttelnd 1 min auf einem Multivortexer und 1 min inkubierend in einem Heizblock bei 95 °C. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Nach der Lyse wurde 1 ml Immunpräzipitation (IP) Puffer und 1x complete Inhibitor Cocktail zugegeben und unlösliche Bestandteile bei V_{max} für 15 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Für die IP wurden 950 µl des Überstandes mit Antikörper versetzt und für 1 Stunde oder über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Mit 6,25 % (w/v) Protein A Sepharose erfolgte für zwei Stunden oder über Nacht bei 4 °C die Bindung an die Antikörper. Die Sepharose wurde dreimal mit IP Puffer gewaschen, um dann die immunpräzipitierten Proteine in 50 µl Harnstoffpuffer aufzunehmen. Die Proben wurden für 2 min bei 42 °C inkubiert, um Proteinkomplexe aufzulösen. Durch SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend unter Vakuum auf einem Geltdrockner getrocknet. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. Die Signale wurden mit einem PhosphorImager (Storm 860) eingescannt und mit Hilfe der Software ImageQuANT 5.2 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

BB1 Puffer

50 mM Tris/HCl pH7,5
6 M Harnstoff
1 % SDS
1 mM EDTA

IP Puffer

50 mM Tris/HCl pH7,5
190 mM NaCl
1,25 % TritonX-100 (v/v)
6 mM EDTA

4.4.9 Membranextraktionsexperiment

100 OD₆₀₀ Zellen logarithmisch, in synthetischem Minimalmedium wachsende Zellen wurden bei einer optischen Dichte von 0,8 bis 1,5 OD₆₀₀ geerntet. Die Zugabe von 20 µM Methotrexat inhibierte die DHFR Domäne von CTD*. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C unter restriktive Bedingungen gesetzt. Cycloheximid wurde in einer Konzentration von 0,6 mg ml⁻¹ dazugegeben und sogleich wurden 50 OD₆₀₀ Zellen zum angegebenen Zeitpunkt entnommen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Die Zellen wurden mit 2 ml ddH₂O, 2 ml eiskaltem 20 mM Natriumazid und mit 2 ml eiskaltem Sorbitolpuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 0,5 ml Sorbitolpuffer und 300 µl Glasperlen (Ø 0,40-0,60mm) resuspendiert. Die Zellen wurden durch 10 minütiges vortexen auf einem Multivortexer bei 10 °C aufgelöst. Ein sanfter Zentrifugationsschritt für 5 min und 500 xg bei 4 °C folgte und der Überstand wurde schließlich bei 100 000 xg für 45 min bei 4 °C in einer Beckman Ultrazentrifuge (TLA 120.2 Rotor; 11 x 34 mm polykarbonierte Zentrifugenröhrchen) abzentrifugiert. Das Pellet wurde wieder mit eiskaltem Sorbitolpuffer gewaschen. Die Membranproteine wurden 1 Stunde bei 10 °C auf einem Drehrad in 1 ml Solubilisierungspuffer solubilisiert und dann bei 32 600 xg für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. 1/10 Volumen des Überstandes wurde mit 110 %iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt und mit 100 % Aceton gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl Harnstoff Puffer aufgenommen und für 2 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend folgten SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion.

NaN₃

20 mM NaN₃
1 mM PMSF
20 mM NEM

Sorbitolpuffer

0,7 M Sorbitol
50 mM Tris/HCl pH7,5
1 mM PMSF
1 µg/µl Pepstatin A
20 mM NEM

Solubilisierungspuffer

1 % SDS

4.4.10 Sphäroblastieren von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

(nach Guthrie and Fink, Yeast genetics, Part C, Vol 351)

Die Vorkultur wurde in synthetischem Minimalmedium bis zur stationären Phase angezogen und erneut in Vollmedium (YPD) verdünnt, um bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,8 OD₆₀₀ zu wachsen. 100 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet, einmal in ddH₂O, einmal in 10 mM NaN₃ gewaschen und anschließend in 2 ml Tris Puffer resuspendiert und für 20 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte ein sanfter Zentrifugationsschritt bei 500 xg für 5 min bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde dann in 2 ml S-Puffer, der 0,3 mg ml⁻¹ Zymoylase 100-T enthielt, resuspendiert und für 1 Stunde bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Sphäroblasten wurden danach nochmals sanft bei 500 xg für 5 min abzentrifugiert und in 2 ml S-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 500 xg für 5 min wurden die Sphäroblasten zweimal vorsichtig, nur mit einer 1 ml Pipettenspitze, in 2 ml Lyse Puffer resuspendiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren bei 2000 xg für 5 min bei 4 °C abgetrennt. Mit dem daraus entstandenen Überstand wurde weiter gearbeitet.

Tris Puffer

100 mM EDTA
0,5 % β-Mercaptoethanol
10 mM Tris/HCl pH7,5

S-Puffer

1,2 M Sorbitol
0,5 mM MgCl₂
40 mM HEPES pH7,5

Lyse Puffer

200 mM Sorbitol
1 mM EDTA
50 mM Tris/HCl pH7,5

Inhibitoren für Lyse Puffer:

- 1 mM PMSF
- 0,5 µg ml⁻¹ Leupeptin
- 0,7 µg ml⁻¹ Pepstatin A
- 2 µg ml⁻¹ Aprotinin
- 1 x complete Inhibitor
- 200 mg ml⁻¹ Benzamidin

4.4.11 ProteinaseK-Experiment

Saccharomyces cerevisiae Zellen wurden vor dem Zellaufschluß durch Sphäroblastierung (siehe 2.4.10) für 30 min mit 7,5 mg ml⁻¹ Cycloheximid in YPD und 75 µM ml⁻¹ MG132 unter Schütteln bei 30 °C behandelt.

Der Überstand wurde in drei gleiche Fraktionen aufgeteilt und entweder mit Lysepuffer, ProteinaseK (0,75 mg ml⁻¹) oder Proteinase K (0,75 mg ml⁻¹) und Triton X-100 (1 %) für 30 min auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde anschließend mit 30 mM PMSF gestoppt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 100 000 xg und 4 °C in einer Beckman Ultrazentrifuge (TLA 120.2 Rotor; 11 x 34 mm polykarbonierte Zentrifugenröhrchen) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer vorsichtig resuspendiert und gewaschen. Erneut wurden die Proben in einer Beckman Ultrazentrifuge (TLA 120.2 Rotor; 11 x 34 mm polykarbonierte Zentrifugenröhrchen) bei 100 000 xg für 20 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 150 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert und für eine Stunde bei 10 °C auf einem Drehrad inkubiert. Es wurden 1350 µl IP Puffer zugegeben und weitere 20 min bei 10 °C rotieren lassen. Es folgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 100 000 xg für 20 min bei 4 °C. Der Überstand wurde mit Antikörpern versetzt und über Nacht bei 10 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die mit 10 % BSA in IP Puffer (ohne TritonX-100) geblockte Protein A Sepharose (6,25 % (w/v)) pro Probe zugegeben und für weitere zwei Stunden auf dem Drehrad bei 10 °C rotiert. Danach wurde dreimal mit IP-Puffer gewaschen und in 50 µl Harnstoffpuffer für zwei min unter Schütteln bei 42 °C gelöst. Es folgten SDS PAGE, Western Blot und Immundetektion.

Lysepuffer

- 200 mM Sorbitol
- 1 mM EDTA
- 50 mM Tris/HCl pH7,5

Solubilisierungspuffer

- 1 % SDS

IP Puffer

- 50 mM Tris/HCl pH7,5
- 190 mM NaCl
- 1,25 % TritonX-100 (v/v)
- 6 mM EDTA

Inhibitoren für Lyse Puffer

- 1 mM PMSF
- 0,5 µg ml⁻¹ Leupeptin
- 0,7 µg ml⁻¹ Pepstatin
- 2 µg ml⁻¹ Aprotinin
- 1 x complete Inhibitor
- 200 mg ml⁻¹ Benzamidin

Inhibitoren für IP Puffer

- 1 mM PMSF
- 1 x complete Inhibitor

4.4.12 Detektion polyubiquitinerter Membranproteine

100 OD₆₀₀ Zellen logarithmisch, in synthetischem Minimalmedium wachsende Zellen wurden bei einer optischen Dichte von 0,8 bis 1,5 OD₆₀₀ geerntet und mit kaltem ddH₂O gewaschen. Die Zellen wurden anschließend für 3 min bei 4 °C und 2800 xg pelletiert. Danach wurden sie in 20 mM kaltem NaN₃ resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal für 3 min bei 4 °C und 2800 xg pelletiert. Es wurde mit 2 ml Sorbitolpuffer gewaschen und bei V_{max} für 1 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 300 µl Glasperlen (Ø 0,40-0,60mm) und 0,5 ml Sorbitolpuffer versetzt. Die Zelllyse erfolgte durch 10 minütiges vortexen auf einem Multivortexer bei 10 °C. Anschließend wurde 1 ml Sorbitolpuffer dazugegeben und kurz gevortext. Es folgte ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 500 xg und 4 °C. Der Überstand wurde nun in einer Beckman

Ultrazentrifuge (TLA 120.2 Rotor; 11 x 34 mm polykarbonierte Zentrifugenröhrchen) bei 100 000 xg für 35 min bei 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit 600 µl Cytosolpuffer und Antikörper versetzt und einige Stunden bis über Nacht auf einem Drehrad bei 10 °C inkubiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Sorbitolpuffer gewaschen und nochmals bei 100 000 xg für 20 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 150 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert und für 45 min bei 10 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 1350 µl IP Puffer nochmals 15 min bei 10 °C auf einem Drehrad inkubiert. Es folgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 100 000 xg für 35 min bei 4 °C. Der Überstand wurde mit Antikörper versetzt und mindestens 1 Stunde oder über Nacht auf einem Drehrad bei 10 °C rotiert. Anschließend wurde die mit 10 % BSA in IP Puffer (ohne TritonX-100) geblockte Protein A Sepharose (6,25 % (w/v)) pro Probe zugegeben und für weitere zwei Stunden oder über Nacht auf dem Drehrad bei 10 °C geschüttelt. Danach wurde dreimal mit IP Puffer gewaschen und in 50 µl Harnstoffpuffer für zwei min unter Schütteln bei 42 °C gelöst. Es folgten SDS PAGE, Western Blot und Immundetektion.

NaN₃	Sorbitolpuffer	Cytosolpuffer	IP Puffer
20 mM NaN ₃	0,7 M Sorbitol	50 mM Tris/HCl pH7,5	165 mM NaCl
1 mM PMSF	50 mM Tris/HCl pH7,5	1 % TritonX-100	50 mM Tris/HCl pH7,5
20 mM NEM	1 mM PMSF	5 mM EDTA	1,1 % TritonX-100
	1 µg µl ⁻¹ Pepstatin A	165 mM NaCl	5,5 mM EDTA
	20 mM NEM	0,1 % SDS	1 x complete Inhibitor
		2 µg µl ⁻¹ Aprotinin	2 µg µl ⁻¹ Aprotinin
		1 x complete Inhibitor	

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der ERAD-Substrate

Die korrekte Faltung von neusynthetisierten sekretorischen und membrangebundenen Proteinen in ihre native, dreidimensionale Konformation wird von einem Protein-Qualitätskontrollsystem (PQC) im endoplasmatischen Retikulum (ER) überwacht (Ellgaard und Helenius, 2003; Ellgaard *et al.*, 1999). Es vermittelt die Rückfaltung mutierter Proteine oder deren Abbau (Wickner *et al.*, 1999). Vergleichbare Qualitätskontrollsysteme wurden darüber hinaus auch im Zytosol, in Mitochondrien und kürzlich auch im Nukleus identifiziert (Käser und Langer, 2000; Gardner *et al.*, 2005; McClellan *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007; Eisele und Wolf, 2008). Falsch gefaltete sekretorische Proteine werden im ER erkannt, ins Zytosol retrotransloziert und vom dort lokalisierten Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eliminiert (Hiller *et al.*, 1996; Kostova und Wolf, 2003; Meusser *et al.*, 2005; Eisele *et al.*, 2010).

Eine Vielzahl an Komponenten des ER-assoziierten Degradationsweges (ERAD) und des UPS konnten bereits identifiziert (Hiller *et al.*, 1996; Hampton *et al.*, 1996; Deak und Wolf, 2001) sowie zahlreiche ERAD-Substrate charakterisiert werden. Es wird versucht ein Modell für ERAD und die PQC im ER abzuleiten. Da die ERAD-Substrate zu große strukturelle Unterschiede aufweisen und dadurch unterschiedliche Faktoren in der Erkennung der Fehlfaltung der Proteine notwendig sind, ließen sie bisher nur wenig Rückschlüsse auf die Gemeinsamkeiten und Verschiedenheiten der am Abbau beteiligten Komponenten und Mechanismen zu (Taxis *et al.*, 2003; Vashist und Ng, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). Um das Verständnis für den Abbau falsch gefalteter Proteine zu erweitern, ist es unabdingbar, neue Kenntnisse über einige weitere Komponenten und ihrer Wirkungsweise in der PQC und im ERAD zu erlangen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung einer Klasse einfach vergleichbarer ERAD-Substrate, die die mutierte Carboxypeptidase yscY (CPY*; G255R) als das ER lumenale ERAD-Erkennungsmotiv gemeinsam haben. Mit der Konstruktion von auf dieser fehlgefalteten Domäne beruhenden unterschiedlichen Modellsubstraten sollten weitere Kenntnisse über die beteiligten ERAD-Komponenten und verschiedene mögliche Degradationsmechanismen gewonnen werden.

5.1.1 Die ERAD-L Substrate CTG*, CTL*myc und CTD*

Es wurden drei strukturell vergleichbare ERAD-Substrate generiert, die die mutierte Carboxypeptidase yscY (CPY*) als das ER lumenale ERAD-Degradationsmotiv gemeinsam haben. CPY* ist ein lösliches Protein, das sich im ER-Lumen befindet (Finger *et al.*, 1993) und dessen Verhalten in ERAD bereits sehr gut charakterisiert ist

(Plempner und Wolf, 1999; Plempner *et al.*, 1999a; Deak und Wolf, 2001). CTG* ist ein Typ II Membranprotein, bei dem das grün fluoreszierende Protein (GFP) über die isolierte letzte Transmembrandomäne (TMD) des ABC-Transporterproteins Pdr5 an den C-Terminus von CPY* fusioniert wurde (Kostova und Wolf, 2005). Die im Zytosol lokalisierte GFP-Domäne ist korrekt gefaltet und fluoresziert nach Anregung aktiv (Taxis *et al.*, 2003). CTL*myc besteht aus einer Fusion von CPY*, der letzten TMD des Pdr5 Proteins und der zytosolisch lokalisierten 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2) (Medicherla *et al.*, 2004; Buschhorn *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde das Substrat am Carboxy-Terminus mit dem myc-Epitop markiert (Kohlmann *et al.*, 2008). Das dritte ERAD-Substrat CTD* zeigt im Lumen den gleichen modularen Aufbau wie CTG* und CTL*myc, doch trägt es auf seiner zytosolischen Seite die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus. Die DHFR-Domäne ist durch den kompetitiven Inhibitor Methotrexat (MTX) von einer loseren, schwächer gefalteten in eine kompakte, starke Konformation überführbar (Eilers und Schatz, 1986), so dass CTD* zwei topologisch distinkte Formen in einem Molekül vereint, weshalb es in der vorliegenden Arbeit als weiteres Substrat zu CTG* und CTL*myc dienen soll. Um die zytosolischen Domänen der Substrate entfalten zu können, müssen Kräfte aufgebracht werden. Daher stellt ein zentrales Kriterium, bei den in dieser Arbeit untersuchten Experimenten, die Kräfte dar, die zum Entfalten der zytosolischen Domänen der ERAD-Substrate benötigt werden. Bei allen drei Substraten handelt es sich um integrale Membranproteine des Typ II. Dabei befinden sich ihre Carboxy-Termini auf der zytosolischen Seite, während ihre Amino-Termini innerhalb des ERs zu finden sind. Die drei Substrate sind in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt.

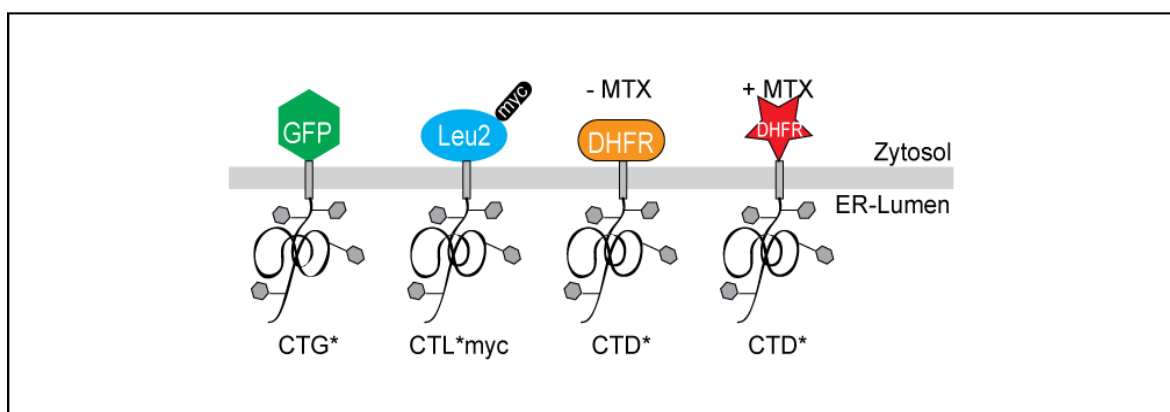


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der ERAD-Substrate CTG*, CTL*myc und CTD* ohne und mit MTX. Bei allen Substraten handelt es sich um Typ I Membranproteine, die ein gemeinsames Degradationsmotiv im Lumen des ER tragen – die mutierte Carboxypeptidase Y.

5.1.2 Mutierte Carboxypeptidase Y (CPY*) als Degradationsmotiv

Die vorgestellten ERAD-Substrate CTG*, CTL*myc und CTD* (Abbildung 5.1) enthalten alle das gleiche Degradationsmotiv, die fehlgefaltete Carboxypeptidase Y, im Lumen des

ERs: Die Punktmutation in CPY* durch den Aminosäureaustausch des Glycins an der Position 255 zu Arginin macht diese zu einem fehlgefalteten Protein. Zunächst wurde gezeigt, dass die Fusionsproteine nicht aufgrund ihrer Membranverankerung, die aus der letzten Transmembrandomäne des mehrfach die Membran durchspannenden Pdr5 Proteins besteht, von der Proteinqualitätskontrolle (PQC) erkannt und dem Abbau zugeführt werden. Dies wurde exemplarisch für CTG* untersucht. Hierfür wurde der CPY*-Anteil des Fusionsproteins CTG* durch die nicht mutierte Form der Carboxypeptidase Y (CPY) ersetzt und somit das Fusionsprotein CTG hergestellt. Als Kontrolle dazu wurde die lösliche Wildtyp-Form der CPY getestet. CTG und CPY sollten nicht im ER zurückgehalten werden und in die Vakuole transportiert werden, wo CPY N-terminal zur reifen Form proteolytisch prozessiert wird. In Abbildung 5.2 A ist in einem mit CPY-spezifischen Antikörpern detektierten Western Blot die Prozessierung von CPY und CTG zu einem ungefähr 61 kDa reifen Protein zu sehen. Im Fall von CTG wird der CPY-Anteil des Proteins offensichtlich von der Transmembrandomäne abgeschnitten und wie lösliche CPY gereift. CPY* und CTG* weisen eine molekulare Größe auf, die den nicht gereiften, im ER lokalisierten Proteinen entspricht.

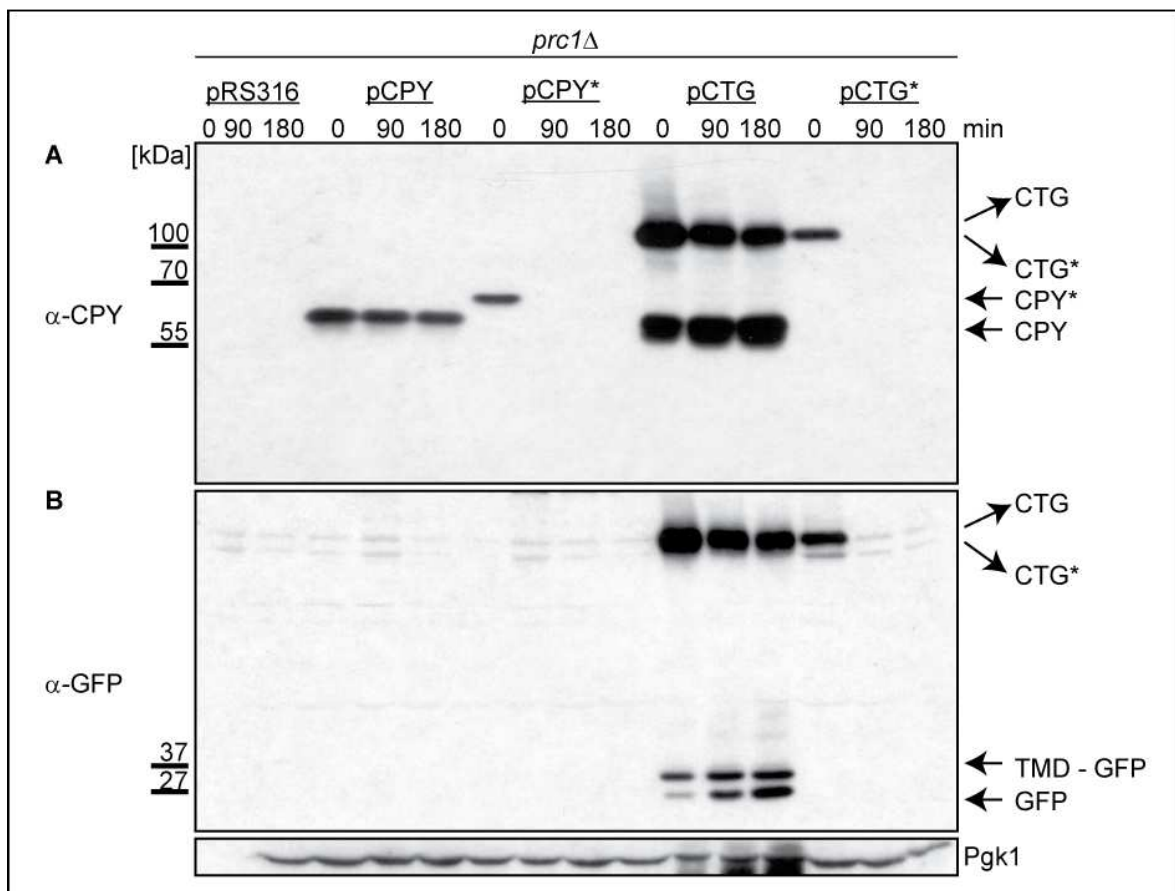


Abbildung 5.2: Die Substrate CPY* und CTG* enthalten beide das gleiche Degradationsmotiv im Lumen des ER: Die Punktmutation in CPY*. Die Cycloheximid-Chase Analyse wurde mit dem Wildtypstamm YWO 636, in dem *PRC1* deletiert ist, durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen. Der Western Blot wurde in (A) mit CPY-spezifischen Antikörpern, in (B) mit GFP-spezifischen

Antikörpern und die Ladekontrolle mit PGK-spezifischen Antikörpern detektiert. CPY, CPY* CTG und CTG* wurden von den Plasmiden pCT70, pHIT341, pCT68 und pMA1 (Taxis *et al.*, 2003) respektive exprimiert.

Es kann mit GFP-spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass CTG weiter prozessiert wird zu Transmembrandomäne-GFP (TMD-GFP)- und GFP-Anteilen des Fusionsproteins (Abbildung 5.2 B). Die Fragmente bleiben jedoch über die Zeit stabil liegen. Dies deutet darauf hin, dass CTG, wie CPY, in die Vakuole transportiert wird, wo die Prozessierungen stattfinden und nur ein mutierter CPY-Teil der Fusionsproteine für die Erkennung als fehlgefaltetes Protein verantwortlich ist. Dies lässt auch darauf schließen, dass die PQC nicht die Transmembrandomäne der Fusionsproteine als Abbausignal erkennt.

5.1.2.1 Lokalisierung der akkumulierten Fragmente von TMD-GFP und GFP

Die Experimente aus Abbildung 5.2 B konnten zeigen, dass CTG, welches die nicht mutierte Form der CPY enthält, über die Zeit in Fragmente gespalten wird, welche anhand ihrer molekularen Größen als TMD-GFP- (35 kDa) und GFP- (27 kDa) Teil identifiziert wurden. Zur Lokalisierung der Fragmente TMD-GFP und GFP, die in der Vakuolenmembran erwartet wurden, wurde ein Cycloheximid-Chase Experiment mit *S. cerevisiae* Zellen durchgeführt und zu den Zeitpunkten $t = 0, 60, 120$ und 180 min 1 OD_{600} Zellen geerntet, die sofort mit dem HOECHST-Farbstoff 33342 behandelt wurden, um den Zellkern im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar zu machen und von den anderen Organellen abzugrenzen. Der Zellkern wird vom ER umhüllt. Die Vakuole nimmt einen Großteil des Zellvolumens ein.

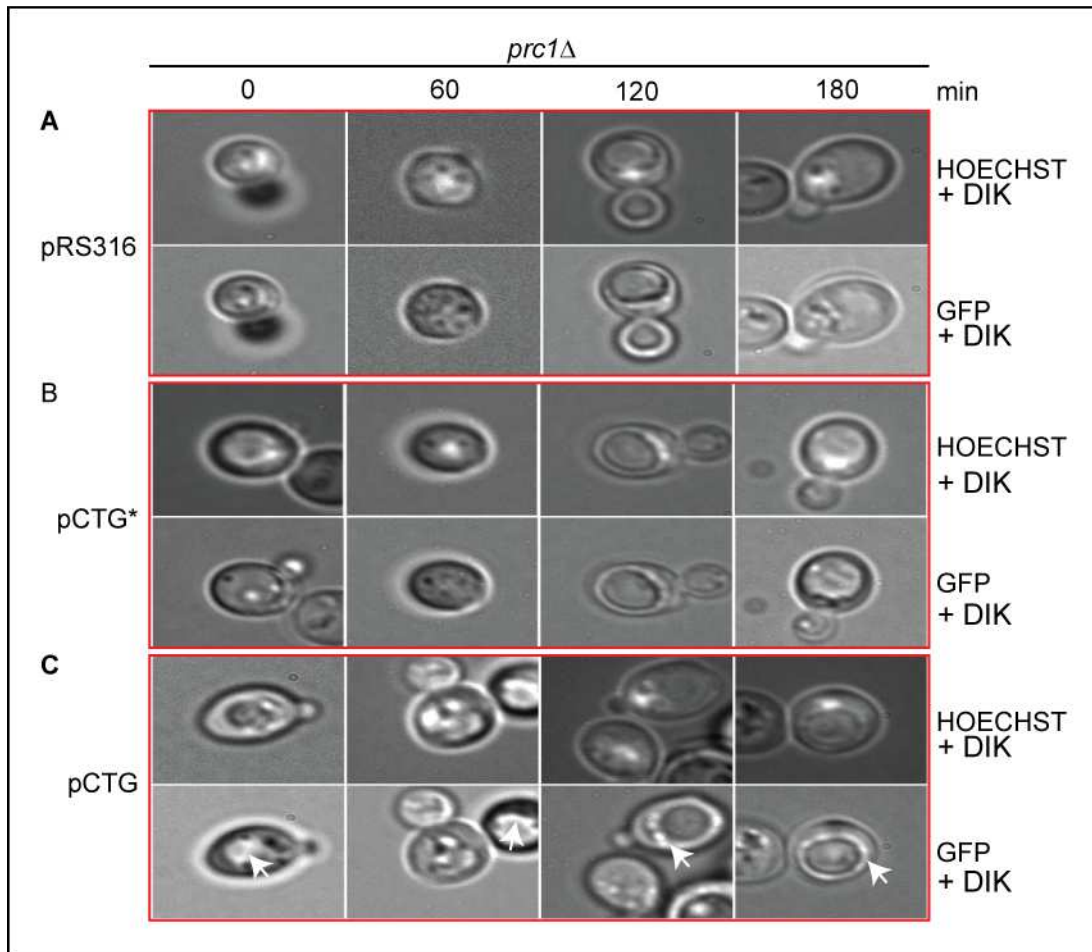


Abbildung 5.3: Die akkumulierten Fragmente von CTG, TMD-GFP und GFP, werden in die Vakuolenmembran eingelagert. Es wurde ein Cycloheximid-Chase Experiment, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Zu den genannten Zeiten wurden Proben entnommen. Diese wurden mit 30 mM NaN₃ auf Eis inkubiert, um den gesamten Metabolismus zu stoppen. Anschließend wurden die Proben zweimal mit ddH₂O gewaschen und anschließend in 500 µl synthetisches Minimalmedium aufgenommen, das 1 µl 2 mM HOECHST 33342 enthielt, für 15 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Gen *PRC1* ist in dem verwendeten Wildtypstamm YWO 636 deletiert. Die CTG und CTG* exprimierenden Plasmide pCT68 und pMA1 sowie das Kontrollplasmid pRS316 wurden verwendet.

Die Fluoreszenz des TMD-GFP- und GFP-Teils von CTG zeigt eine für Vakuolen-Lokalisation typische Verteilung (Abbildung 5.3, C; weiße Pfeile), die über die Zeit zunimmt. CTG und CTG* befinden sich währenddessen nur zum Zeitpunkt t = 0 min im ER (Abbildung 5.3, B). Zur besseren Bestimmung der Lokalisation wurden der Differentialinterferenzkontrast (DIK) und der Fluoreszenzkanal übereinander gelagert.

5.1.3 Methotrexat

Methotrexat (MTX) ist ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) (Rajagopalan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000). Das Enzym DHFR reduziert unter NADPH-Verbrauch Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat und ist somit für die Nukleotidbiosynthese und die Herstellung bestimmter Aminosäuren unverzichtbar (Schnell *et al.*, 2004;

Urlaub und Chasin, 1980). MTX wird als Zytostatikum in der Behandlung von Krebs (Hagner und Joerger, 2010) und Autoimmunerkrankungen (Morgan und Baggott, 2010) verwendet, aber auch als Abtreibungsmittel zur Beendigung von Bauchhöhlen- oder Eileiterschwangerschaften (Mol *et al.*, 2008). Da Zytostatika sowohl das Zellwachstum als auch die Zellteilung hemmen können, wurde zunächst überprüft, ob MTX einen toxischen Effekt auf die Zellviabilität von *S. cerevisiae* ausübt. Der Anteil toter Zellen wurde qualitativ durch die Färbung mit Propidiumiodid (PI), das ein Nukleinsäureinterkalator ist, und anschließender Vermessung mit Hilfe von Durchflusszytometrie bestimmt (Soudant *et al.*, 2005). Das Emissionsmaximum von PI verschiebt sich von 590 nm auf 617 nm, wenn PI in die DNA interkaliert. Flüssig Zellkulturen, die CTD* exprimieren, wurden ohne oder mit 20 µM MTX behandelt und zu den Zeitpunkten t = 0 Stunden und t = 3 Stunden vermessen.

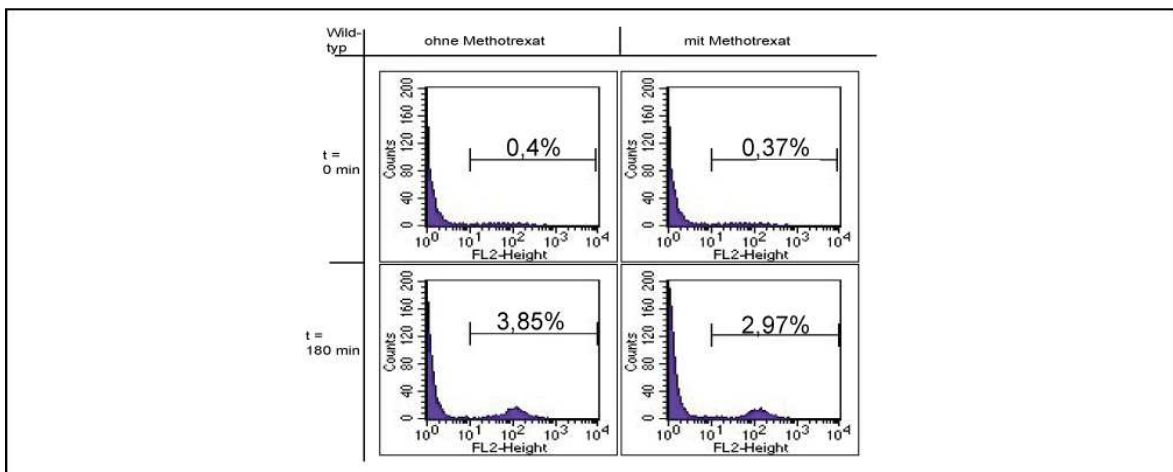


Abbildung 5.4: Methotrexat (MTX) beeinträchtigt die Zellviabilität nicht. Propidiumiodid (PI)-Messungen zu den Zeitpunkten t = 0 min und t = 3 Stunden. PI ist ein Nukleinsäureinterkalator, der verwendet wird, um apoptotische von lebenden Zellen zu differenzieren. Die Histogramme zeigen die Häufigkeitsverteilung der detektierten Spezies in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen an. Tote Spezies erfahren im Histogramm eine deutliche Rechtsverschiebung zu höheren Fluoreszenzkanälen. Der Wildtypstamm YWO 636, der eine Deletion des *PRC1* Gens aufweist, wurde mit CTD* transformiert und dort wo angegeben, wurde 20 µM MTX 30 min vor der Zellernte zugegeben.

Über 3 Stunden wurde in den Zellkulturen, die mit MTX inkubiert wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen, kein signifikanter Anstieg des Anteils an toten Zellen detektiert (Abbildung 5.4). Da die Zellviabilität durch MTX nicht gestört ist, können Experimente durchgeführt werden, die Aufschluß über die unterschiedlichen Abbaumechanismen des ERAD-Substrats CTD* mit und ohne Zugabe von Methotrexat geben sollen.

5.2 ER-Qualitätskontrolle und assoziierte Degradation (ERQD)

5.2.1 Kar2 ist am Abbau von Membranproteinen beteiligt

Kar2 ist das ER lumenale Chaperon der Bäckerhefe, das der hoch konservierten Hsp70-Familie angehört. Das Säugetierprotein BiP ist ein Ortholog von Kar2, das in den Proteinimport in das ER involviert ist (Rapoport *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass die Kar2-Aktivität im Falle der fehlgefalteten CPY* benötigt wird, um CPY* in einem löslichen Zustand zu halten und seine Dislokation ins Zytosol zu ermöglichen (Nishikawa *et al.*, 2001). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass für den Abbau von fehlgefalteten, löslichen Proteinen wie CPY* (Plempner *et al.*, 1998; Plempner *et al.*, 1997), mutiertem α -Faktor und α 1-Proteaseinhibitor aus Säugetieren (Brodsky *et al.*, 1999b) die Aktivität von Kar2 notwendig ist. Dagegen spielt es bei der Degradation von falsch gefalteten Membranproteinen wie Pdr5* (Plempner *et al.*, 1998), CFTR (Zhang *et al.*, 2001), Vph1 (Hill und Cooper, 2000), Sec61-2 (Nishikawa *et al.*, 2001) sowie CT* und CTG* (Dissertation S. H. Park, 2008; Taxis *et al.*, 2003) keine Rolle. Es sollte im weiteren Verlauf geklärt werden, ob Kar2 generell beim Abbau von Membranproteinen nicht beteiligt ist, oder ob es doch in spezifischen Fällen für die Erkennung der mutierten CPY erforderlich ist. Die vorangegangenen Studien wurden mit einer temperatursensitiven *kar2-159* Mutante durchgeführt, die Defekte im ERAD, der Proteinfaltung, der Translokation und der Retrotranslokation aufzeigt (Taxis *et al.*, 2003; Plempner *et al.*, 1997; Plempner *et al.*, 1998; Brodsky *et al.*, 1995). In ersten Experimenten der vorliegenden Arbeit mit einer *kar2-159* Mutante konnte beobachtet werden, dass das 'steady-state' (engl.) Proteinniveau der ERAD-Substrate in der *kar2-159* Mutante offensichtlich geringer ist als mit korrespondierenden Wildtyp *S. cerevisiae* Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde dem durch die *kar2-159* Mutation ausgelösten temperatursensitiven Translokationsdefekt zugeschrieben. Daher wurden Pulse-Chase Analysen mit translokationskompetenten *kar2-1* und *kar2-133* Mutanten durchgeführt (Brodsky *et al.*, 1999; Kabani *et al.*, 2003; Kimata *et al.*, 2003), die weiterhin Defekte im ERAD und der Retrotranslokation aufweisen, jedoch nun ein gleiches 'steady-state' Proteinniveau wie der zugehörige Wildtyp *S. cerevisiae* Stamm zeigen.

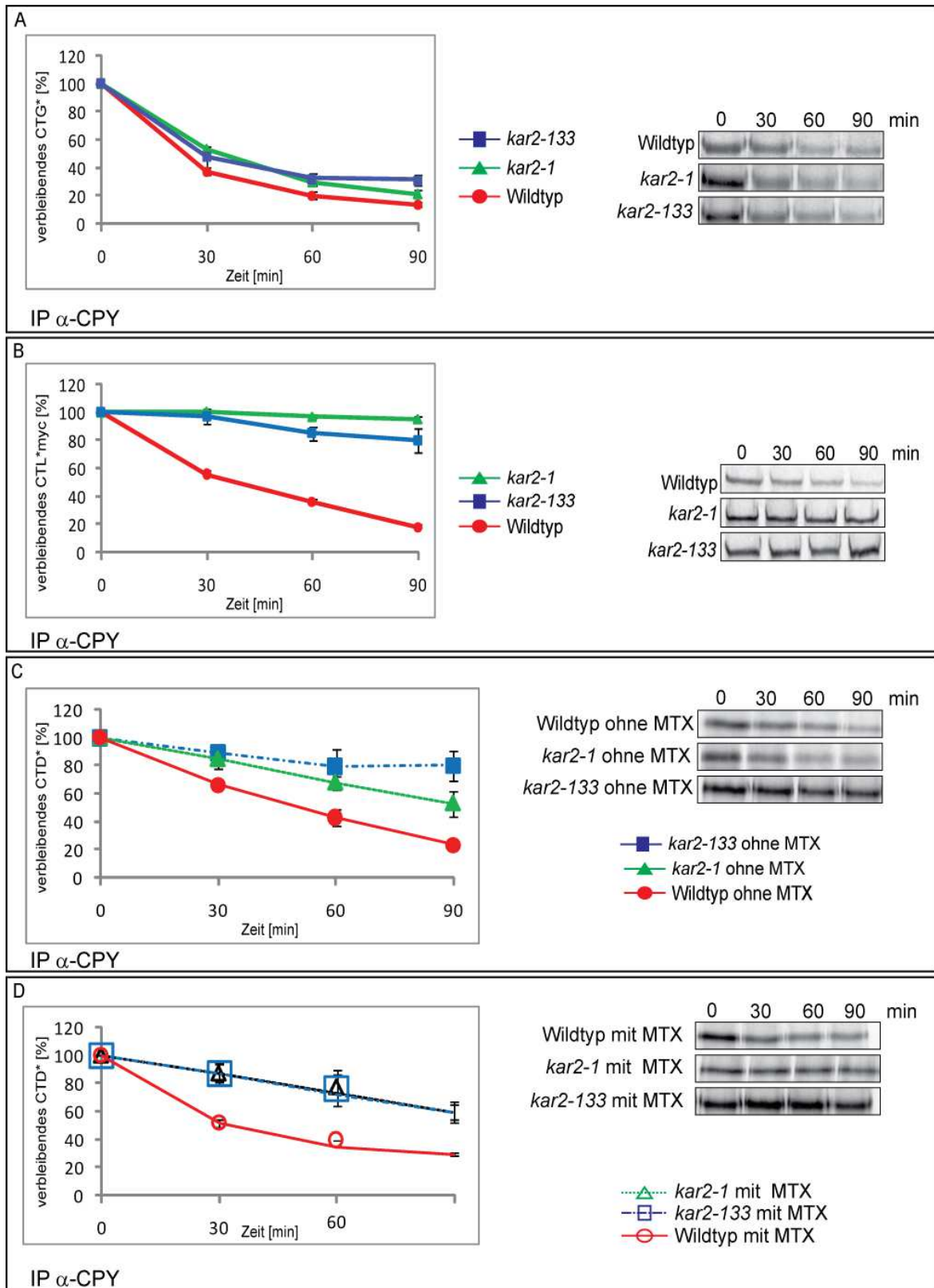


Abbildung 5.5: Kar2, das lumenale Hsp70-Chaperon, ist auch für den Abbau von einigen membrangebundenen Proteinen erforderlich. Die Pulse-Chase Experimente wurden, wie im Methodenteil erläutert, durchgeführt. Die *S. cerevisiae* Zellen wurden nach dem metabolischen Markieren auf 37 °C umgesetzt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Für die Analyse wurden die Kulturen YWO 1715 (WT), YWO 1716 (*kar2-1*) und YWO 1717 (*kar2-133*) verwendet. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (A) Das für CTG* codierende Plasmid PWO 0621 wurde

transformiert. Es wurde mit CPY-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. (B) Das Experiment wurde mit dem für CTL*myc exprimierenden Plasmid PWO 1035 durchgeführt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit myc-spezifischen Antikörpern. (C + D) CTD* -Expression vom Plasmid PWO 1197. Es wurden CPY-spezifische Antikörper für die Immunpräzipitation verwendet. (D) 20 μ M MTX wurden zeitgleich mit dem 35 S-Methionin zugegeben. Die Kurven der Stämme *kar2-1* und *kar2-133* mit MTX überlagern sich exakt.

Aus den Pulse-Chase Experimenten in Abbildung 5.5 A wird ersichtlich, dass Kar2 nur einen geringfügigen Einfluss auf den Abbau von CTG* ausübt. Der Abbau von CTL*myc hingegen ist vollständig von Kar2 abhängig (Abbildung 5.5 B). Wenn dieser gegensätzliche Effekt auf unterschiedlich stark gefaltete zytosolische Domänen der ERAD-Substrate zurückzuführen ist, würde man bei der Annahme, dass GFP im Vergleich zu Leu2 „stärker“ gefaltet ist, für das ERAD-Substrat CTD* eine intensivere Stabilisierung ohne MTX als mit MTX erwarten. Diese Annahme trifft auf CTD* ohne MTX in der temperatursensitiven *kar2-133* Mutante unter restriktiven Bedingungen teilweise zu (Abbildung 5.5 C). Die Abbaukinetiken von CTD* mit MTX sind in beiden temperatursensitiven Mutanten exakt die gleichen und zeigen eine reduzierte Stabilisierung im Vergleich zu CTD* ohne MTX in *kar2-133* Zellen. Bemerkenswerterweise wird CTD* ohne MTX in der *kar2-1* Mutante schneller degradiert als die kompakte CTD*-Form mit MTX. Die Pulse-Chase Analysen legen jedoch deutlich dar, dass Kar2 in den Abbau von CTD* ohne MTX involviert ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die Funktion von Kar2 nicht auf den Abbau löslicher lumenaler, fehlgefalteter Proteine beschränkt ist. Es ist im Moment unklar in welcher Weise die zytosolische Domäne funktionell mit dem Abbau der Substrate und der Wirkung von dem lumenalen Hsp70-Chaperon Kar2 verknüpft ist.

5.2.2 Das Chaperon Rot1 ist nicht an der ERAD beteiligt

Rot1 fungiert als molekulares Chaperon im ER, indem es Aggregationen ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine verhindert und für die Faltung naszierender Proteine verantwortlich ist (Takeuchi *et al.*, 2006a; Takeuchi *et al.*, 2006b; Takeuchi *et al.*, 2008; Stolz und Wolf, 2010). Aufgrund der Tatsache, dass Rot1 und Kar2 *in vivo* interagieren (Takeuchi *et al.*, 2006a), wurde angenommen, dass Rot1 ein Co-Chaperon von Kar2 sein könnte. In Kapitel 5.2.1 konnte gezeigt werden, dass Kar2 nur marginal am Abbau von CTG* beteiligt ist (Abbildung 5.5 A). Folglich war es von besonderem Interesse, ob Rot1 in Kooperation mit Kar2 an der ERAD von CTG* eine Rolle spielt. Dies wurde mit Pulse-Chase Experimenten überprüft. Es konnte beobachtet werden, dass Rot1 nicht in den Abbau von CTG* involviert ist. Eine *kar2-1 rot1-2*-Doppelmutante zeigte keinen Effekt in der Degradation von CTG* (Abbildung 5.6 A). Darüber hinaus beeinflusste das ER-Chaperon Rot1 auch nicht die Abbaukinetik des ERAD-Substrats CTL*myc

(Abbildung 5.6 B). Es kann demzufolge angenommen werden, dass es sich bei Rot1 um kein allgemeines Chaperon des ERAD-L-Weges handelt.

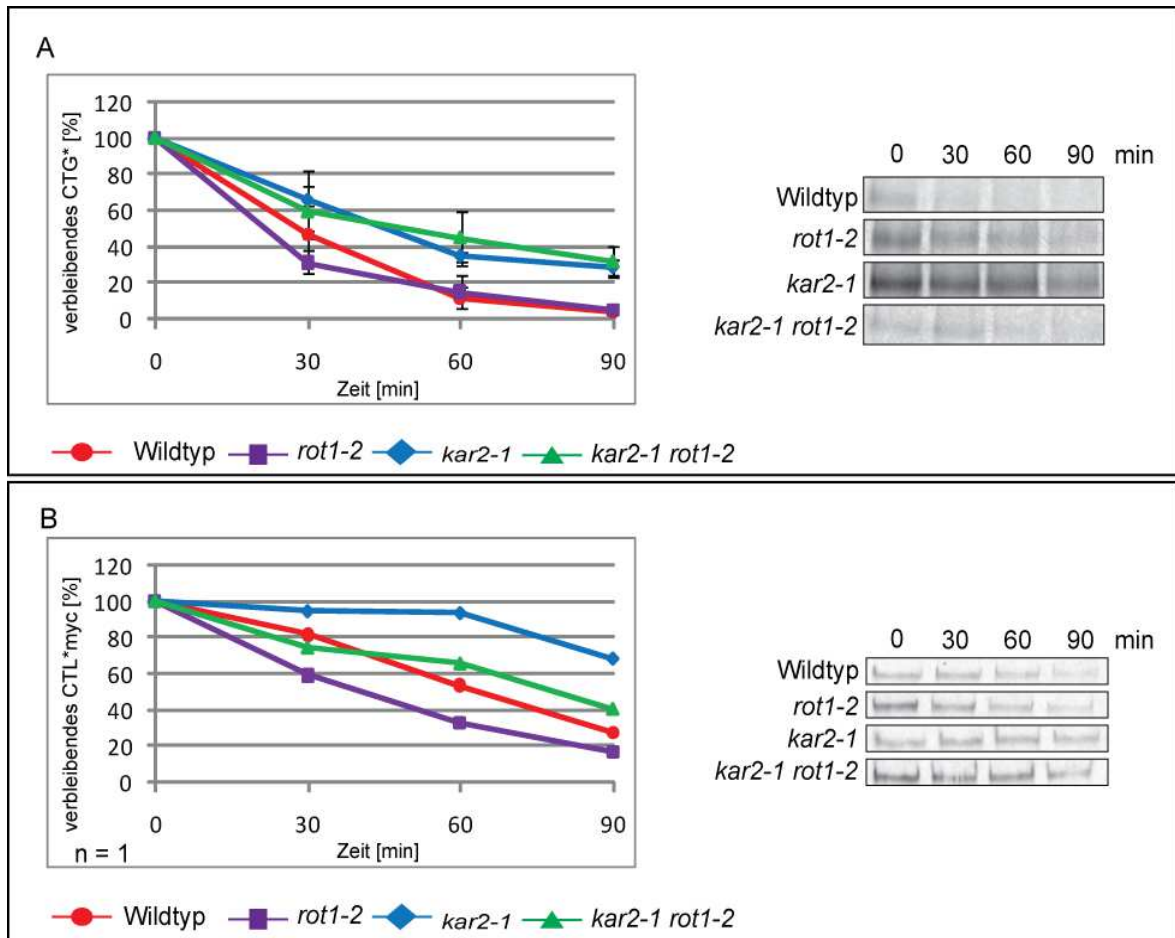


Abbildung 5.6: Rot1 ist kein generelles Chaperon des ERAD-L-Weges. Pulse-Chase Analysen wurden mit den Kulturen YWO 1723 (WT), YWO 1724 (*rot1-2*), YWO 1727 (*kar2-1*) und YWO 1728 (*kar2-1 rot1-2*) durchgeführt. (A) Die *S. cerevisiae* Zellen wurden mit dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 0621 transformiert. Nach Zugabe des ³⁵S-Methionins wurden die Zellen auf 37 °C umgesetzt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen. Die Immunpräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (B) CTL*myc-Expression erfolgte vom Plasmid PWO 1035. Die Zellen wurden bei 25 °C angezogen und mit Beginn der radioaktiven Markierung bei 30 °C inkubiert. Es wurde mit myc-spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Kurven präsentieren ein Experiment.

5.2.3 Der1 ist am Abbau von integralen Membranproteinen beteiligt

Das vierfach die Membran durchspannende Protein Der1 wird über Usa1 an die Der3/Hrd1 Ubiquitin Ligase gebunden, die, zusammen mit Hrd3, Komponenten des Retrotranslokationskomplexes (RTK; engl. RTC) darstellen (Knop *et al.*, 1996; Gauss *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Hitt *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2009; Eisele *et al.*, 2010). Eine spezifische Funktion von Der1 ist immer noch unklar, jedoch wird diskutiert, ob Der1 neben Sec61 Teil des Retrotranslokons sein könnte (Lilley und Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2006). In früheren Veröffentlichungen

konnte gezeigt werden, dass Der1 sowohl für den Abbau von fehlgefalteten löslichen Proteinen, wie zum Beispiel CPY*, PrA* (Knop *et al.*, 1996) und KHN₁ (Vashist *et al.*, 2001) als auch des Membranproteins KWW (Vashist *et al.*, 2004) notwendig ist. Für die Mehrzahl der membrangebundenen Proteine (Pdr5*, Sec61-2, Hmg2, CT* und CTG*) war eine Beteiligung von Der1 für den proteasomalen Abbau entbehrlich (Plempner *et al.*, 1998; Brodsky und McCracken, 1999; Carvalho *et al.*, 2006; Taxis *et al.*, 2003). Da die Derlin Säugerproteine (Derlin-1 bis -3) ortholog zu Der1 sind, und es bereits bekannt ist, dass diese für die Degradation von löslichen als auch membrangebundenen ERAD-Substraten erforderlich sind (Ye *et al.*, 2004; Lilley und Ploegh, 2004; Oda *et al.*, 2006; Younger *et al.*, 2006), sollte im weiteren Verlauf der Arbeit überprüft werden, ob Der1 speziell in den Abbau von KWW involviert ist und andere integrale Membranproteine Der1-unabhängig abgebaut werden.

Um auszuschließen, dass die gemessenen Werte in der *DER1* deletierten Mutante durch die Versuchsbedingungen verursacht wurden, wurde als Kontrolle zuerst das Abbauverhalten von CPY* in der in dieser Arbeit neu hergestellten *der1*-Deletionsmutante anhand eines Cycloheximid-Chase Experimentes getestet.

Die in Abbildung 5.7 A dargestellte Abbaukinetik von CPY* zeigt deutlich, dass die mutierte Form von CPY im Vergleich zum Wildtyp in der *der1Δ* Mutante stabilisiert wird. Somit kann der in dieser Arbeit neu hergestellte *S. cerevisiae* Stamm YWO 1730 für weitere Versuche zum Proteinabbau verwendet werden.

Wie aus den Pulse-Chase Analysen in Abbildung 5.7 C hervorgeht, wird das ERAD-L-Substrat CTL*myc in einer *der1Δ* Mutante über 90 Minuten vollständig stabilisiert. Wie bereits bei Taxis *et al.* (2003) gezeigt, wird dagegen das zytosolisch kompakt gefaltete Substrat CTG* in einer *der1*-Deletionsmutante nur marginal stabilisiert (Abbildung 5.7 B). Daraus lässt sich schließen, dass Der1 auch am Abbau anderer integraler Membranproteine beteiligt ist als KWW.

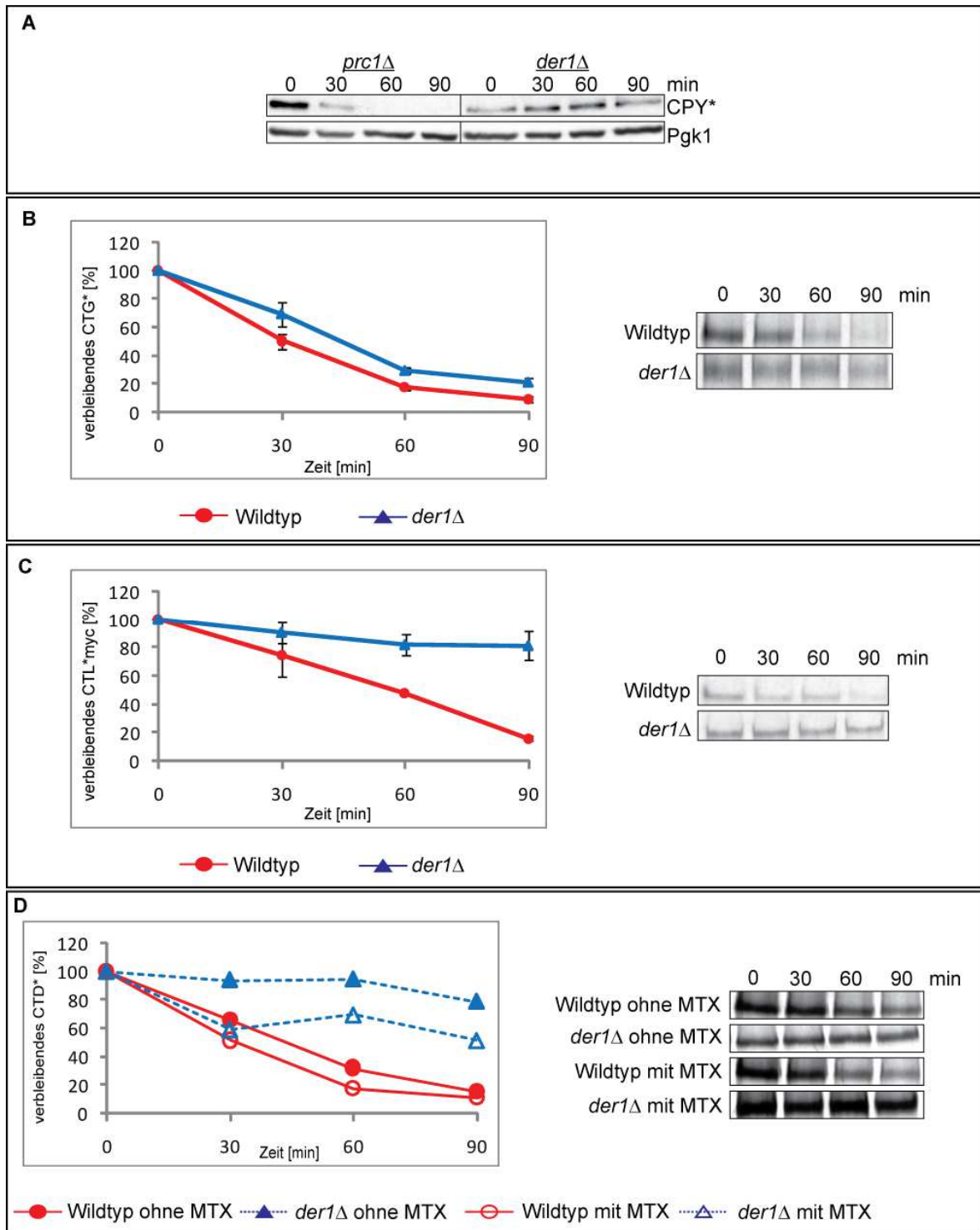


Abbildung 5.7: Der1p ist für den Abbau von membrangebundenen Substraten mit lumenalem CPY*-Anteil notwendig. Die Pulse-Chase Analysen und Cycloheximid-Chase Analysen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit den Kulturen YWO 636 (WT) und YWO 1730 (*der1Δ*), die beide eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1* besitzen, durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. (A) Das für CPY* codierende Plasmid pHIT341 wurde transformiert. Die Immundetektion im Western Blot erfolgte mit CPY-spezifischen und PGK-spezifischen (Ladekontrolle) Antikörpern. (B) Das Plasmid PWO 0621 (CTG*) wurde in diesen Pulse-Chase-Experimenten verwendet. Die Immunpräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (C) Das für CTL*myc exprimierende Plasmid PWO 1035 wurde transformiert. In diesen Pulse-Chase Analysen

wurden myc-spezifische Antikörper für die Immunpräzipitation verwendet. (D) Für die Pulse-Chase Analysen wurde das Plasmid PWO 1197 (CTD*) verwendet. 20 μ M MTX wurden wo angegeben zeitgleich mit dem 35 S-Methionin zugegeben. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Ob seine Beteiligung auf die Erkennung der unterschiedlich gefalteten zytosolischen Domänen der ERAD-L-Substrate beschränkt ist, sollte mit Hilfe des ERAD-Substrats CTD*, dessen Faltung durch MTX beeinflusst wird, überprüft werden. Wie aus dem Pulse-Chase Experiment in Abbildung 5.7 D ersichtlich wird, werden beide Formen von CTD*, mit und ohne Zugabe von MTX, in einer *der1*-Deletionsmutante über einen Zeitraum von 90 Minuten stabilisiert. Allerdings beträgt die Halbwertszeit des CTD*-Substrats ohne MTX in der *der1 Δ* Mutante ungefähr 80 min, während die Halbwertszeit für den CTD*+MTX weit über 90 min liegt. Die gewonnenen Erkenntnisse scheinen zu zeigen, dass die unterschiedlich ausgeprägte Beteiligung von Der1 am Abbau der Membranproteine durch die verschiedenartigen zytosolischen Domänen der ERAD-L-Substrate bedingt ist. Offenbar beeinflussen strukturell unterschiedliche zytosolische Domänen die Notwendigkeit von Der1 am Abbau der lumenalen CPY*.

5.2.4 Die E3-Ligase Doa10 ist nicht am Abbau von CTG* beteiligt

Es konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die membrangebundenen ERAD-L-Substrate CTG* und CT* zu einem gewissen Maß in einer *der3/hrd1*-Deletionsmutante abgebaut werden (Taxis *et al.*, 2003), während das ERAD-L-Substrat CTL*myc vollständig stabilisiert wird (Kohlmann *et al.*, 2008). Der beobachtete Effekt für die Substrate CTG* und CT* könnte durch die Beteiligung einer zusätzlichen Ubiquitin-Ligase bedingt sein. Für die Erkennung und Polyubiquitinierung von ERAD-C-Substraten wie zum Beispiel Ubc6 und Ste6* ist die 14fach die Membran durchspannende E3-Ligase Doa10 erforderlich (Swanson *et al.*, 2001; Vashist und Ng, 2004). Daher wurde das Degradationsverhalten von CTG* in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppelmutante untersucht. Die Pulse-Chase Experimente zeigen keinen Unterschied in der Abbaukinetik von CTG* in einer *der3/hrd1*-Einfachdeletionmutante im Vergleich zu einer *der3/hrd1 Δ doa10 Δ* -Doppelmutante (Abbildung 5.8 A). Dies bedeutet, dass andere Komponenten in den Abbauprozess involviert sein können. Hrd3 ist ein weiterer Bestandteil des Retrotranslokationskomplexes (RTK), der über seine lange lumenale Domäne mit der aminoterminalen Transmembrandomäne von Der3/Hrd1 interagiert (Gardner *et al.*, 2000). In einer *hrd3*-Deletionsmutante wird Der3/Hrd1 RING-H2-Domänen-abhängig abgebaut (Gardner *et al.*, 2000; Plemper *et al.*, 1999) und führt automatisch zum Phänotyp einer *der3/hrd1 Δ hrd3 Δ* -Doppelmutante. In Pulse-Chase Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Halbwertszeit von CTG* in einer *hrd3 Δ* Mutante im Vergleich zu einer *der3/hrd1*-Einfachdeletionsmutante nicht verändert (Abbildung 5.8 A). Somit bewirkt

weder Doa10 noch Hrd3 zusätzliche Effekte eines möglichen E3-Enzyms. Im Gegensatz zu CTG* wird das ERAD-L-Substrat CTD* unabhängig von der Zugabe von MTX über 90 min komplett in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppelmutante stabilisiert (Abbildung 5.8 B) und benötigt für den Abbau keine weiteren Ubiquitin-Ligasen.

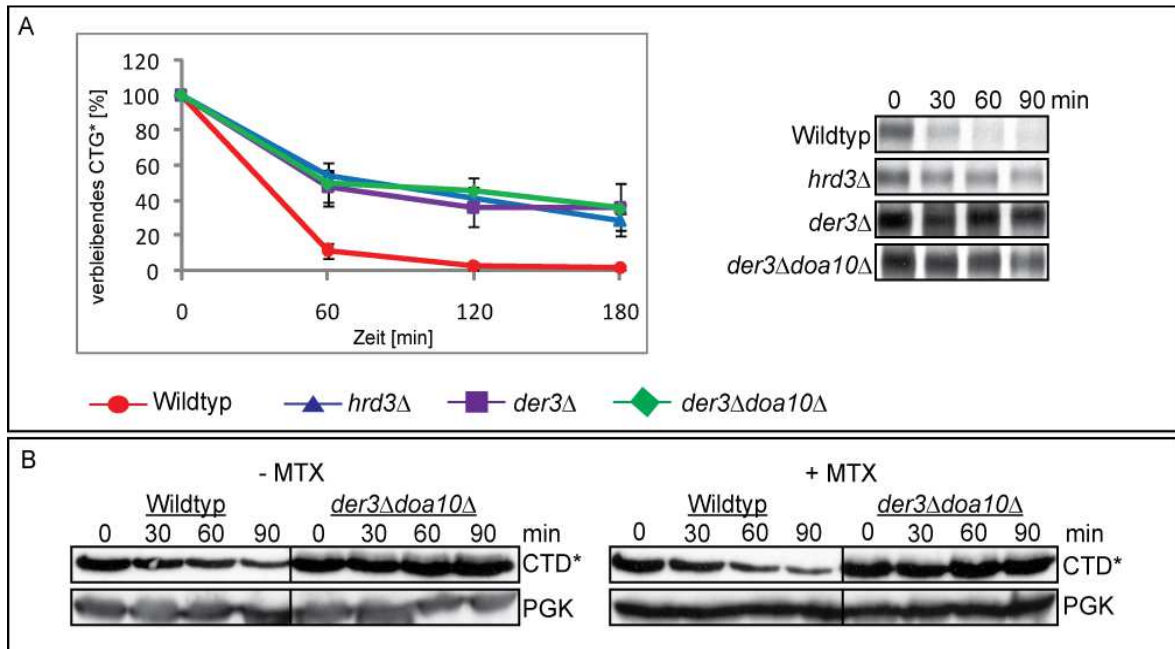


Abbildung 5.8: Die ER membrangebundene E3-Ligase Doa10 ist nicht in den Abbau von CTG* involviert. (A) Die Kulturen YWO 636 (WT), YWO 1652 (*hrd3*Δ), YWO 1408 (*der3*Δ) und YWO 1528 (*der3*Δ*doa10*Δ) wurden zusammen mit dem Plasmid PWO 0621 für die Pulse-Chase Analysen verwendet. Diese Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und, wie im Methodenteil beschrieben, weiter verarbeitet. CPY-spezifische Antikörper wurden bei der Immunpräzipitation verwendet. (B) Die Stämme YWO 636 und YWO 1528 wurden mit dem Plasmid PWO 1197 transformiert. Das Cycloheximid-Chase Experiment wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. 20 μM MTX wurden 30 min vor Zugabe von Cycloheximid zugegeben und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Detektion im Western Blot erfolgte durch DHFR-spezifische, die Ladekontrolle mit PGK-spezifischen Antikörpern.

5.2.5 Das zytosolische Hsp70-Chaperon Ssa1 in ERAD

Nicht nur beim Protein-Import in Mitochondrien und ins ER (Becker *et al.*, 1996) sind die Chaperone der Ssa-Familie beteiligt. Sie spielen gleichermaßen eine Rolle bei der Proteinfaltung (Johnson und Craig, 2001), bei der Translation (Horton *et al.*, 2001) und bei der Proteindegradation (Zhang *et al.*, 2001). Hier scheint es so, dass hauptsächlich ERAD-C-Substrate (Zhang *et al.*, 2001; Hyuer *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Gusarova *et al.*, 2001) und Substrate der zytosolischen Qualitätskontrolle (engl.: cytoQC) (Park *et al.*, 2007; McClellan *et al.*, 2005; Metzger *et al.*, 2008; Juretschke *et al.*, 2010) abhängig von Ssa1 sind. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das zytosolische Chaperon Ssa1 der Hsp70-Familie nicht am Abbau von löslichen missgefalteten Proteinen wie zum Beispiel CPY* (Deak *et al.*, 2001) oder eines

Transmembranproteins ohne zytosolische Domäne wie CT* (Taxis *et al.*, 2003) beteiligt ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass für den Abbau von Transmembranproteinen mit gefalteter zytosolischer Domäne (CTG*; Taxis *et al.*, 2003) Ssa1 erforderlich ist. Genauso konnte in *in vitro* Studien belegt werden, dass das 26S Proteasom allein unfähig ist, GFP-Fusionsproteine abzubauen (Liu *et al.*, 2003). Daraus wurde geschlossen, dass die Beteiligung von Ssa1 vermutlich notwendig ist, um die stark gefaltete Struktur des GFP-Teils zu entfalten um dem Proteasom den Abbau des gesamten Proteins zu ermöglichen. Im Folgenden wurde mittels Pulse-Chase Experimenten untersucht, ob unterschiedlich gefaltete zytosolische Domänen Einfluss auf die Beteiligung des Hsp70-Chaperons Ssa1 auf deren ERAD besitzt.

In der Hefe *S. cerevisiae* existieren vier Gene, SSA1-SSA4, die für die Hsp70-Chaperone der Ssa-Familie codieren. Unter allen Spezies sind die Hsp70-Chaperone hoch konserviert (Craig und Lindquist, 1988) und besitzen untereinander eine 80 – 97%-ige Sequenzidentität (Craig *et al.*, 1993). Die Expression eines Ssa-Chaperons ist essentiell. Es wurden Zellen untersucht, bei denen die Gene SSA2-SSA4 deletiert waren und entweder Ssa1 oder das temperatursensitive, bei restriktiven Bedingungen nicht funktionelle Ssa1-45^{ts} Protein exprimiert wurde. In ersten Untersuchungen mit nicht isogenen Hefestämmen wurde in der *ssa1-45* Punktmutante gegenüber SSA1 Wildtypzellen ein vergleichsweise geringes Wachstum beobachtet. Da die Ergebnisse untereinander vergleichbar sein sollten, wurden sowohl die *ssa1-45* Punktmutante als auch der SSA1 Wildtypstamm in einen Zellhintergrund integriert, der isogen zum W303 *S. cerevisiae* Stamm ist. Das Zellwachstum und die extrahierten Proteinmengen waren danach untereinander in den beiden *S. cerevisiae* Stämmen vergleichbar. Zunächst wurde der Abbau von CTG* getestet, und es konnte gezeigt werden, dass dieses ERAD-L-Substrat auch im W303 Stammhintergrund SSA1-abhängig abgebaut wird (Abbildung 5.9 A). Im Fall von CTL*myc konnte ein etwas verlangsamter Abbau in der *ssa1-45* Punktmutante im Vergleich zu SSA1 Wildtypzellen beobachtet werden, der jedoch zu keiner substantiellen Stabilisierung führte (Abbildung 5.9 B). Die Pulse-Chase Experimente mit dem ERAD-L-Substrat CTD* hingegen zeigten wieder eine Beteiligung von Ssa1 am Abbau. Diese lassen aber keine bevorzugte Beteiligung von Ssa1 an der Degradation einer der beiden unterschiedlich stark gefalteten Konformationen von CTD* mit und ohne MTX erkennen (Abbildung 5.9 C).

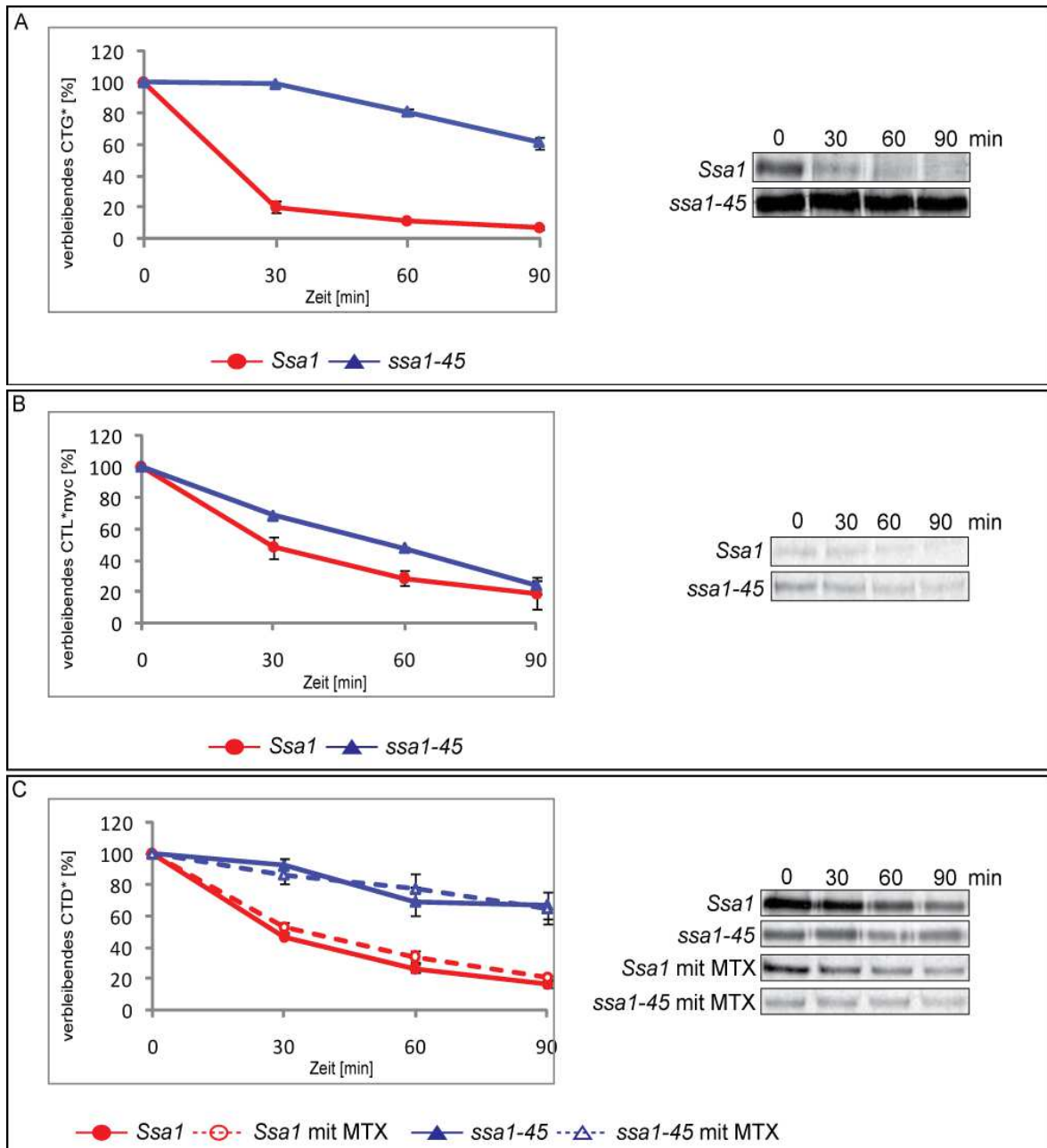


Abbildung 5.9: Der Abbau der Transmembransubstrate in Abhängigkeit von dem zytosolischen Hsp70-Chaperon Ssa1. Die Pulse-Chase Experimente erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Für die Analyse wurden die Kulturen YWO 1590 (*SSA1*) und YWO 1710 (*ssa1-45*) verwendet. Die Stämme besitzen eine Deletion im *PRC1* Gen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. (A) Das für CTG* codierende Plasmid PWO 0621 wurde transformiert und die Immunpräzipitation wurde mit CPY-spezifischen Antikörpern durchgeführt. (B) Es wurde das Plasmid PWO 1035 verwendet, welches die codierende Sequenz für CTL*myc enthält. Es wurden myc-spezifische Antikörper für die Immunpräzipitation eingesetzt. (C) Das für CTD* exprimierende Plasmid PWO 1197 wurde transformiert. Es wurde mit CPY-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. 20 µM MTX wurden gleichzeitig mit dem radioaktiven ³⁵S-Methionin zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Aus den Experimenten zur Beteiligung von Ssa1 am Abbau der ERAD-L-Substrate kann geschlossen werden, dass Ssa1 für die Transmembransubstrate mit zytosolisch

verschiedenen Domänen wie CTG* und CTD* mit und ohne MTX benötigt wird, jedoch nicht für CTL*myc

5.2.6 Indirekter Einfluß des Hsp40-Co-Chaperons Ydj1 auf den Abbau von CTD*

Die Substratspezifität der Hsp70-Chaperone wird durch Hsp40-Co-Chaperone der DnaJ-Familie moduliert (Misselwitz *et al.*, 1998; Johnson und Craig, 2001; Rudiger *et al.*, 2001). Die Co-Chaperone der Hsp40-Familie binden mit ihrer 75 Aminosäuren langen aminoterminalen DnaJ Domäne an Hsp70-Chaperone und aktivieren diese (Kelley, 1998; 1999). Aus früheren Veröffentlichungen ist bekannt, dass Ydj1, ein Hsp40-Co-Chaperon der DnaJ-Familie, keinen Einfluß auf den Abbau der bisher getesteten ERAD-Substrate hat, die die mutierte Carboxypeptidase Y (CPY*) als fehlgefaltete Domäne enthalten (Taxis *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu spielt Ydj1 eine Rolle im Abbau von sowohl Ste6* und CFTR (Huyer *et al.*, 2004; Nakatsukasa *et al.*, 2008; Youker *et al.*, 2004), als auch in der zytosolischen Qualitätskontrolle und Degradation (engl. CQD) (Park *et al.*, 2007; Metzger *et al.*, 2008). Hier wurde nun der Abbau von CTD* in Cycloheximid-Chase Experimenten in temperatursensitiven *ydj1-151 S. cerevisiae* Zellen unter restriktiven Bedingungen untersucht.

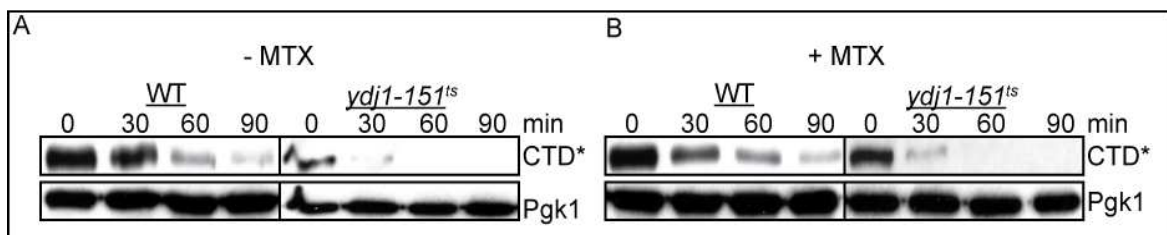


Abbildung 5.10: Der Abbau des ERAD-L-Substrats CTD* erfolgt in den temperatursensitiven *ydj1-151* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beschleunigt. Die Kulturen YWO 636 (WT) und YWO 1719 (*ydj1-151*) besitzen beide eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1* und wurden mit dem Plasmid PWO 1197 transformiert. Die temperatursensitiven *S. cerevisiae* Zellen wurden für die Cycloheximid-Chase Experimente bei 25 °C angezogen. Die Detektion erfolgte durch Western Blot mit DHFR- und PGK-spezifischen Antikörpern (Ladekontrolle). (A) Die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde, wie im Methode nteil beschrieben, Cycloheximid hinzu gegeben und die Zeitproben entnommen. (B) 20 µM MTX wurde hinzugefügt und die Zellen anschließend für eine Stunde bei 37 °C i nkubiert. Die Proteinbiosynthese wurde durch Zugabe von Cycloheximid gestoppt und der Abbau über 90 Minuten verfolgt.

Unabhängig von der Zugabe von MTX wurde CTD* in den *ydj1-151* Mutanten innerhalb von 60 Minuten abgebaut (Abbildung 5.10). Aus der Abbildung 5.10 wird ersichtlich, dass ein Unterschied in der Abbaukinetik zwischen Wildtyp und *ydj1-151 S. cerevisiae* Zellen von CTD* unabhängig von MTX beobachtet werden kann. Überraschenderweise wird CTD* in den *ydj1-151*-Mutantenzellen deutlich schneller abgebaut als in Wildtyp Zellen. Es ist unklar, worauf die Beschleunigung des Abbaus von CTD* zurückzuführen ist. Eine

Möglichkeit wäre eine bei Abwesenheit von Ydj1 fehlende Konkurrenz mit einem weiteren für den Abbau notwendigen Hsp40 Co-Chaperon.

5.2.7 Hsp104-abhängiger Abbau von ERAD-L-Substraten mit zytosolisch gefalteten Domänen

Hsp104 gehört zu der Familie der Hsp100-Chaperone, die einen Teil der AAA-ATPase-Superfamilie darstellen (Schirmer *et al.*, 1996; Neuwald *et al.*, 1999; Fröhlich, 2001). Bereits bekannt ist, dass Hsp104 ATP-abhängig an einen Komplex aus Ssa1 und Ydj1 bindet und mit diesen Chaperonen der Hsp70- und Hsp40-Familien zusammen arbeitet (Glover und Lindquist, 1998). Die Chaperone der Hsp100-Familie helfen, aggregierte Proteine sowohl nach Hitzestress (Glover und Lindquist, 1998) als auch vor der Hydrolyse (Weber-Ban *et al.*, 1999) zu entfalten und neu zu aktivieren. Es wurde bereits veröffentlicht, dass Hsp104 für die Degradation des zytosolisch stark gefalteten ERAD-Substrats CTG* erforderlich ist (Taxis *et al.*, 2003; Abbildung 5.11 A), während ERAD-L-Substrate ohne zytosolische Domäne, wie zum Beispiel CPY* und CT*, unabhängig von Hsp104 abgebaut werden (Taxis *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, ob ERAD-L-Substrate mit anderen zytosolisch gefalteten Domänen wie zum Beispiel CTL*myc und CTD* mit und ohne MTX, Hsp104 zum Abbau benötigen.

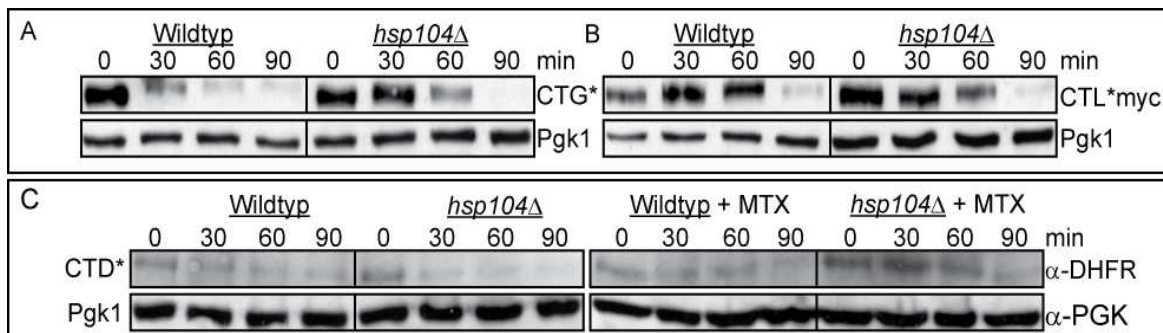


Abbildung 5.11: Das zytosolische Hsp100 Chaperon Hsp104 ist am Abbau des ERAD-Substrats CTD* mit MTX beteiligt. Die Cycloheximid-Chase Analysen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit den Kulturen YWO 1580 (WT) und YWO 1721 (*hsp104Δ*) durchgeführt. Beide Stämme besitzen eine *prc1Δ*-Mutation. Die Proteinbiosynthese wurde durch 0,75 mg ml⁻¹ Cycloheximid gestoppt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen. Für die Detektion der Ladekontrolle auf den Western Blots wurden PGK-spezifische Antikörper verwendet. (A) Die Untersuchung der Abbaukinetik mit dem Substrat CTG* erfolgte mit dem Plasmid PWO 0621. Es wurde mit GFP-spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (B) Das für CTL*myc exprimierende Plasmid PWO 1035 wurde für die Analysen transformiert. Die Detektion im Western Blot wurde mit myc-spezifischen Antikörpern durchgeführt. (C) Um die Abbaukinetik des Substrats CTD* zu erstellen, wurde das für CTD* exprimierende Plasmid PWO 1197 transformiert. Es wurden 20 μM MTX 30 Minuten vor Zugabe von Cycloheximid zugegeben. Das Membranprotein wurde mit DHFR-spezifischen Antikörpern detektiert.

Aus den Cycloheximid-Chase Analysen in Abbildung 5.11 B geht hervor, dass der Abbau von CTL*myc in *HSP104* deletierten *S. cerevisiae* Zellen nicht beeinträchtigt ist. Derselbe

Cycloheximid-Chase Versuch wurde für das ERAD-L-Substrat CTD* durch geführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind uneindeutig und lassen keine klare Aussage über die Beteiligung von Hsp104 am Abbau von CTD* in einer *hsp104Δ*-Deletionsmutante zu.

5.2.8 Die Degradation von CTD* ist Cdc48-abhängig

Cdc48, das Ortholog zu p97/VCP aus Säugetieren, gehört zu der Familie der AAA-ATPasen und ist in Eukaryoten hoch konserviert (Peters *et al.*, 1990). Neben zahlreichen zellulären Aufgaben ist Cdc48 auch an der Dislokation luminaler und ER-membrangebundener Substrate beteiligt (Ye *et al.*, 2001; Bays *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Nakatsukasa *et al.*, 2008).

5.2.8.1 Der Abbau von CTD* mit MTX ist vollständig abhängig von der AAA-ATPase Cdc48

Taxis *et al.* (2003) zeigten, dass die Aktivität des Cdc48-Ufd1-Npl4-AAA-ATPase-Komplexes für den Abbau von ERAD-Substraten unabhängig von der Substrattopologie benötigt wird. Zunächst sollte mittels Pulse-Chase Experimenten nachgewiesen werden, ob diese Aussage auch für weitere Substrate zutrifft, und Cdc48 am Abbau von CTD* beteiligt ist.

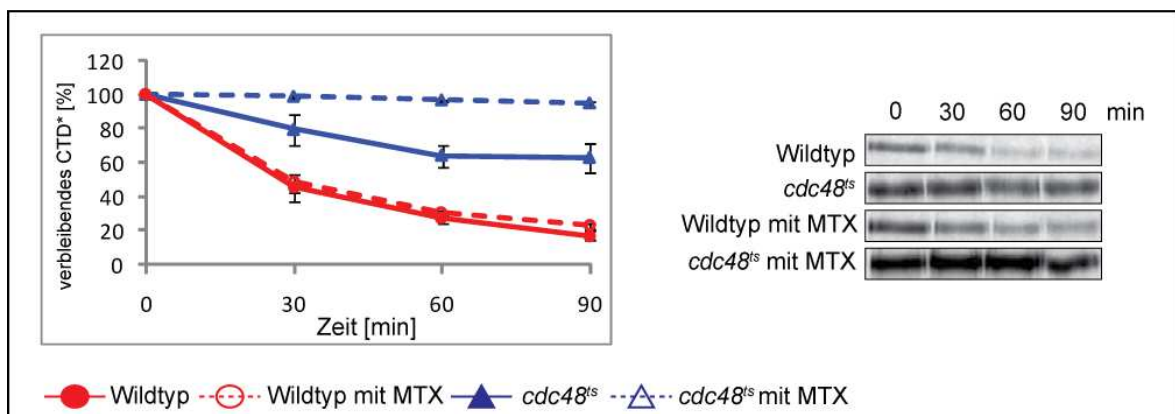


Abbildung 5.12: Die AAA-ATPase Cdc48 ist für den Abbau von CTD* mit MTX essentiell. Die Pulse-Chase Analyse wurde, wie im Methodenteil beschrieben, in den W303 Kulturen YWO 636 (WT) und YWO 1711 (*cdc48^{T413R}*) durchgeführt, die CTD* vom Plasmid PWO 1197 exprimieren. Diese Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. (A) Bei den Pulse-Chase Experimenten wurden zur Immunpräzipitation CPY-spezifische Antikörper eingesetzt. Zeitgleich zum ³⁵S-Methionin wurden 20 μM MTX dazu gegeben und anschließend bei 37°C weiter gearbeitet.

Unter restriktiven Bedingungen konnte ein verlangsamter Abbau des ERAD-L-Substrats CTD* ohne MTX in temperatursensitiven *cdc48^{T413R}*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5.12, ausgefüllte Symbole). Interessanterweise wurde das Substrat CTD* +MTX in temperatursensitiven *cdc48^{T413R}*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unter nicht-permissiven Bedingungen komplett stabilisiert (37 °C)

(Abbildung 5.12, unterbrochene Linie). Die bei beiden Formen des CTD*-Substrats beobachtete Stabilisierung lässt erkennen, dass Cdc48 für dessen Abbau prinzipiell essentiell ist. Jedoch scheint das Ausmaß der Stabilisierung von der Topologie von CTD* abzuhängen, die in der Stärke ihrer Faltung variiert, je nachdem ob MTX dazugeben wurde oder nicht. Offenbar ist ein voll intaktes Cdc48 für die Entfaltung der durch MTX stark stabilisierte Dihydrofolat-Reduktase absolut notwendig, wohingegen eine durch MTX nicht stabilisierte DHFR-Domäne auch langsam ohne Cdc48 entfaltet werden kann.

5.2.8.2 Cdc48 agiert als potenzielle *Unfoldase* und *Segregase*

Die Entfaltung von zur Degradation markierten Proteinen vor dem Abbau durch das Proteasom ist eine grundlegende Voraussetzung (Johnston *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 2007). Zu der Multifunktionalität von Cdc48 gehört auch eine *unfoldase*-Aktivität (engl.; Enzym mit Entfaltungsaktivität) (Golbrik *et al.*, 1999; Beskow *et al.*, 2009). Im vorangehenden Kapitel 5.2.8.1 konnte gezeigt werden, dass das Substrat CTD* bei Zugabe von MTX, also mit zytosolisch stark gefalteter Domäne, in konditionalen *cdc48^{T413R}*-Mutanten nicht mehr abgebaut wird. Zur Überprüfung der denkbaren Cdc48-vermittelten *unfoldase*-Aktivität wurden Membranextraktionsexperimente in temperatursensitiven *cdc48^{T413R}*-Zellen unter restriktiven Bedingungen durchgeführt. Dabei wird angenommen, dass das stabilisierte, noch gefaltete Substrat CTD* +MTX in der ER-Membran verbleibt. Es werden daher in den durchgeführten Versuchen nur die Membranfraktionen analysiert.

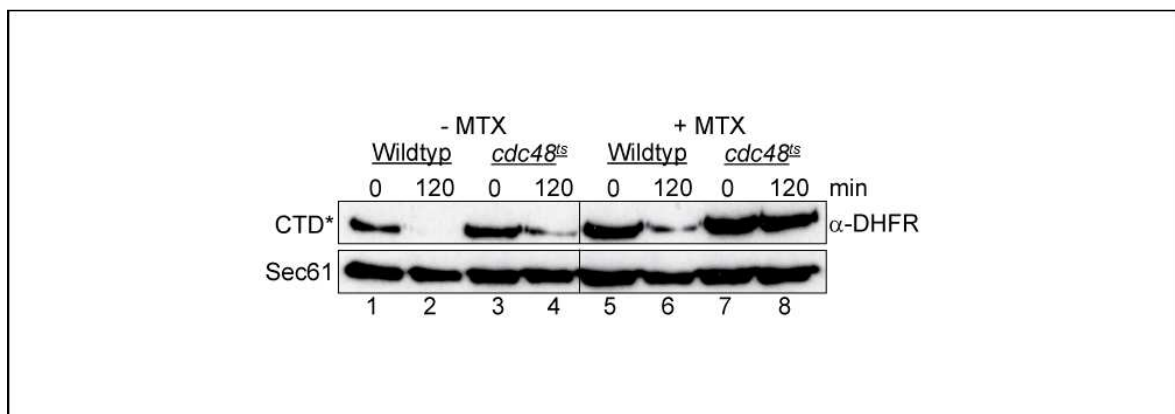


Abbildung 5.13: Die AAA-ATPase Cdc48 agiert als potenzielle *unfoldase*. Die Membranextraktionsexperimente wurden, wie im Methodenteil beschrieben, in den W303 Kulturen YWO 636 (WT) und YWO 1711 (*cdc48^{T413R}*) durchgeführt, die CTD* vom Plasmid PWO 1197 exprimieren. Beide Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. 20 μ M MTX wurden vor Zugabe von Cycloheximid (10 mg ml⁻¹) hinzu gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen. Die Trennung von Zytosol- und Membranfraktion wurden mit einem 100 000 xg Ultrazentrifugationsschritt erreicht. Die Western Blots wurden mit DHFR- und Sec61-spezifischen Antikörpern analysiert.

Wie aus den Pulse-Chase Ergebnissen (Abbildung 5.12) zu erwarten war, wird das zytosolisch schwächer gefaltete CTD* ohne MTX in Wildtyp-Zellen über 2 h abgebaut und

somit auch vollständig aus der ER Membran extrahiert (Abbildung 5.13, Spur 1 + 2). In temperatursensitiven *cdc48^{T413R}*-Zellen verhält sich CTD* ohne MTX ebenfalls analog zu den Pulse-Chase Experimenten und ist nach 2 h deutlich geringfügiger in der ER-Membran lokalisiert als zum Zeitpunkt $t = 0$ min, jedoch noch deutlich detektierbar (Abbildung 5.13, Spur 3 + 4). Während das auf der zytosolischen Seite in der Struktur stark foxierte Substrat CTD* +MTX in Wildtyp-Zellen nur noch marginal nach 2 h in der Membran vorliegt (Abbildung 5.13, Spur 5 + 6; vergleiche Abbildung 5.12, roter durchbrochene Linie), persistiert es in temperatursensitiven *cdc48^{T413R}*-Zellen in der ER-Membran über 2 h (Abbildung 5.13, Spur 7 + 8). Diese Beobachtung legt nahe, dass das Proteasom allein nicht fähig ist, dieses Substrat zu entfalten und aus der Membran zu ziehen. Daher wäre es möglich, dass der gestörte Abbau von CTD* +MTX auf eine fehlende *unfoldase*-Aktivität und Zug-Aktivität der AAA-ATPase Cdc48 zurückzuführen ist.

5.2.9 Beteiligung von Substrat-prozessierenden Kofaktoren von Cdc48 am Abbau der ERAD-L Substrate

Jüngste Ergebnisse zeigten, dass Cdc48 neben seiner Fähigkeit, an (oligo)ubiquitinierte Proteine zu binden und sie von ihren Bindungspartnern zu trennen oder aus Proteinkomplexen herauszuziehen (Rape *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002), auch den Ubiquitinierungsgrad der gebundenen Substrate kontrolliert (Richly *et al.*, 2005; Rumpf und Jentsch, 2006). Während Substrat-rekrutierende Kofaktoren, die *segregase*-Funktion (engl.; Enzym mit der Funktion Proteine zu binden und sie von anderen Proteinkomplexen zu trennen) von Cdc48 herbeiführen, bewirken Substrat-verarbeitende Kofaktoren die Kontrolle des Ubiquitinierungsgrades von gebundenen Substraten (Rape *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2004; Hartmann-Petersen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Rumpf und Jentsch, 2006; Uchiyama *et al.*, 2002; Koegl *et al.*, 1999; Burnett *et al.*, 2003; Stolz *et al.*, 2011).

5.2.9.1 Partieller Abbau der ERAD-L-Substrate in einer *ufd2*-Deletionsmutante

Vorangehende genetische Studien zeigten bereits, dass der Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex bei den meisten ERAD-Substraten für den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) erforderlich ist (Rabinovich *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Bays *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Taxis *et al.*, 2003). Manchmal ist auch das E4-Enzym Ufd2 (engl.; *ubiquitin fusion degradation*) in ERAD involviert (Richly *et al.*, 2005). Ufd2 polyubiquitiniert die Substrate und fördert dadurch ihre proteasomale Degradation (Jentsch und Rumpf, 2007). B. Medicherla zeigte in seiner Dissertation (2004), dass das lumenale ERAD-L-Substrat CPY*3HA nicht Ufd2-abhängig abgebaut wird. Erst einmal sollte mit Hilfe von Cycloheximid-Chase Experimenten überprüft werden, ob Ufd2 am Abbau der drei membrangebundenen ERAD-L-Substrate involviert ist. Der Abbau von CTG*, CTL*myc

und CTD* (unabhängig von MTX) ist in *UFD2* deletierten *S. cerevisiae* Zellen nicht generell gestört (Abbildung 5.14 A-C).

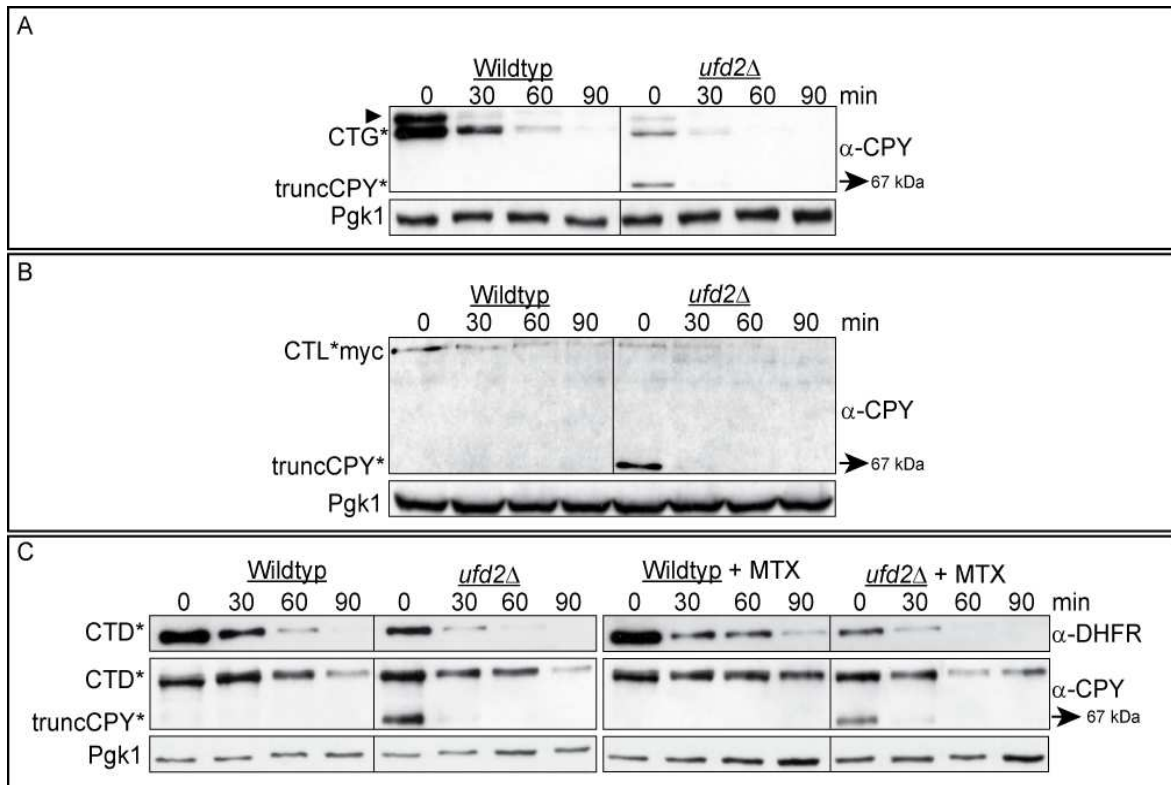


Abbildung 5.14: Die E4-Ligase Ufd2 initiiert den vollständigen Abbau der ERAD-L-Substrate. Die Cycloheximid-Chase Analysen wurden mit den Kulturen YWO 636 (WT) und YWO 1708 (*ufd2Δ*), die beide eine *prc1Δ*-Mutation besitzen, durchgeführt. Es wurden die Plasmide PWO 621, PWO 1035 und PWO 1197 transformiert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und, wie im Methodenteil beschrieben, weiter verarbeitet. Zur Detektion der Ladekontrolle im Westernblot wurden PGK-spezifische Antikörper verwendet. (A) Mit ► gekennzeichnet: Kreuzreaktion des CPY-Antikörpers. (A) und (B) Es wurden CPY-spezifische Antikörper zur Detektion im Westernblot eingesetzt. (C) Die Zellen wurden 30 Minuten vor Cycloheximid Zugabe in 20 μ M MTX inkubiert. Zur Detektion im Westernblot wurden DHFR- und CPY-spezifische Antikörper verwendet.

Bei allen drei ERAD-L-Substraten wird im Western Blot mit einem gegen CPY gerichteten Antikörper in der *ufd2Δ*-Mutante aber zum Zeitpunkt $t = 0$ min ein Zwischenprodukt detektiert (Abbildung 5.14 A-C). Das Zwischenprodukt wird bei einer molekularen Masse von ungefähr 67 kDa nachgewiesen. Da diese Zwischenprodukte ausschließlich mit einem gegen CPY gerichteten Antikörper detektiert werden kann, muss es sich bei den Fragmenten um den N-terminalen-(CPY*)-Bereich der Substrate handeln. Die Zwischenprodukte akkumulieren jedoch nicht und sind nach 30 min vollständig abgebaut. Zusätzlich kann bei allen drei Substraten ein schnellerer Abbau in der *ufd2Δ*-Mutante beobachtet werden als in den Wildtyp-Zellen. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Polyubiquitinierungsfaktor Ufd2 zu Beginn des Abbaus der membrangebundenen Substrate benötigt wird, jedoch sein Fehlen keine nachteiligen Auswirkungen hat und er eventuell durch andere Faktoren ersetzt wird.

5.2.9.2 Otu1 beeinflusst das Degradationsverhalten der membrangebundenen ERAD-L-Substrate nicht

Ein weiterer *substrate-processing cofactor* von Cdc48 ist das deubiquitinierende Enzym Otu1 (engl.; *ovarian tumor*), welches Ubiquitinmodifikationen entfernt (Rumpf und Jentsch, 2006). Mittels Cycloheximid-Chase Analysen wurde das Degradationsverhalten der membrangebundenen ERAD-L Substrate CTG*, CTL*myc und CTD* in Abhängigkeit von Otu1 untersucht.

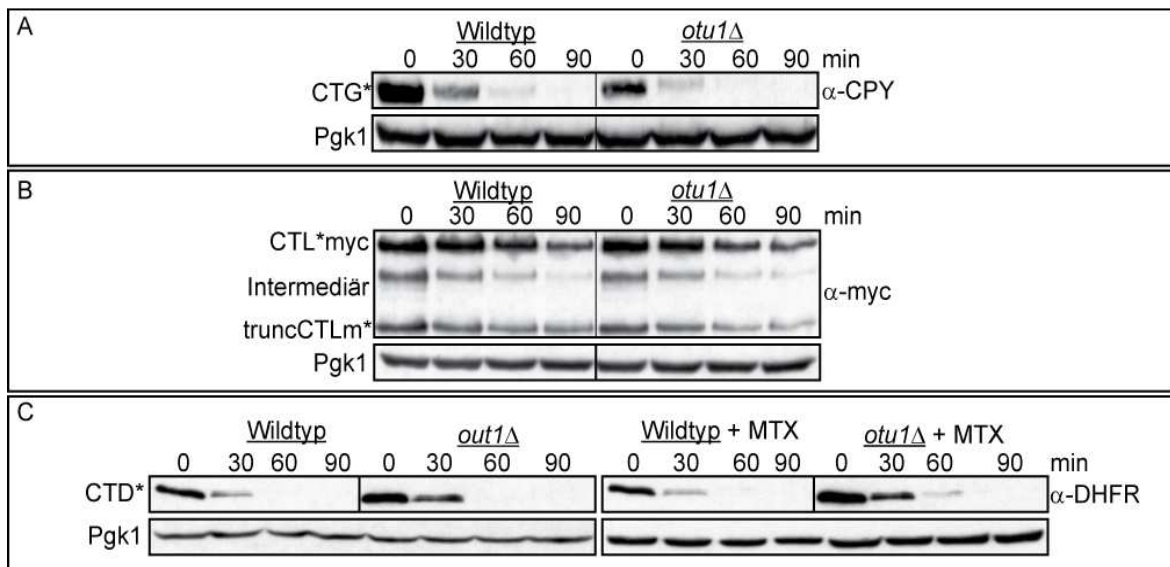


Abbildung 5.15: Das deubiquitinierende Enzym Otu1 hat keinen Einfluß auf den Abbau aller drei ERAD-L-Substrate. Die Cycloheximid-Chase Analysen wurden mit den Kulturen YWO 636 (WT) und YWO 1720 (*otu1Δ*), die beide eine *prc1Δ*-Mutation besitzen, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Für die Detektion der Ladekontrolle im Western Blot wurde ein PGK-spezifischer Antikörper verwendet. (A) Die Experimente wurden mit dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621 durchgeführt. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. (B) Das Plasmid PWO 1035 (CTL*myc) wurde transformiert. Mit myc-spezifischen Antikörpern wurde im Western Blot detektiert. (C) Das für CTD* codierende Plasmid PWO 1197 wurde transformiert und das Membranprotein wurde in einem anti-DHFR-spezifischen Western Blot detektiert.

Der Abbau aller drei ERAD-L-Substrate ist in einem *OTU1* deletierten *S. cerevisiae* Stamm nicht beeinträchtigt (Abbildung 5.15 A-C).

5.2.10 Beteiligung des E4-Enzyms Hul5 am Abbau von CTD*

Hul5 wurde als E4-HECT-Domänen Ubiquitin-Ligase identifiziert, die an der Verlängerung von Ubiquitinketten beteiligt ist (Crosas *et al.*, 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Hul5 für die vollständige Degradation zweier ERAD-Substrate, CTL*myc und Sec61-2Lmyc, entscheidend ist (Kohlmann *et al.*, 2008). Die Autoren beobachteten eine Akkumulation spezifisch verkürzter Formen beider Substrate in einer *hul5Δ*-Mutante. Diese Studie zeigte außerdem, dass CTG* unabhängig von Hul5 abgebaut wird. Es stellt sich daher die Frage, ob die Beteiligung von Hul5 auf die unterschiedlichen zytosolischen

Domänen der Substrate zurückzuführen ist. Durch Cycloheximid-Chase Experimente mit nachfolgender immunologischer Detektion mit gegen DHFR gerichteten Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass der Abbau des auf der zytosolisch stark gefalteten CTD* +MTX Substrats in *HUL5* deletierten *S. cerevisiae*-Zellen über ein definiertes Zwischenprodukt (truncCTD* +MTX) verläuft (nicht gezeigt). Tatsächlich findet eine Anreicherung des C-terminalen Degradationsprodukts von CTD* +MTX in einer *hul5Δ*-Mutante statt, wohingegen in Wildtyp-Zellen das ERAD-L-Substrat komplett abgebaut wird. Für die zytosolisch schwach gefaltete Form von CTD* ohne MTX konnte keine Beteiligung von Hul5 im Abbau gezeigt werden (nicht gezeigt).

Um einen partiellen Abbau des CTD* +MTX Substrats in einem *HUL5* deletierten *S. cerevisiae*-Stamm quantitativ nachweisen zu können, wurde CTD* C-terminal mit einem 13myc-Immuneptop markiert. Das ERAD-L-Substrat CTD*myc entstand, welches nun auch durch gegen das 13myc-Epitop gerichtete Antikörper immunhistochemisch detektierbar ist. Dadurch war es möglich, mit weiteren biochemischen Versuchen den Abbau der C-terminalen Domäne des Fusionsproteins zu untersuchen.

5.2.10.1 CTD*myc +MTX wird in einer *hul5*-Deletionsmutante partiell abgebaut

Wie bereits in Kapitel 5.2.10 beschrieben, erfolgt der Abbau von CTD* +MTX in einer *hul5Δ*-Mutante über ein Zwischenprodukt. Ob es sich bei der Anhäufung von truncCTD* +MTX in einer *hul5*-Deletionsmutante um einen vorübergehenden Effekt oder um eine tatsächliche Stabilisierung des truncCTD* +MTX Zwischenprodukts handelt, sollte durch Pulse-Chase Experimente geklärt werden. Hierfür wurde die Akkumulation von truncCTD*myc +MTX in einem *HUL5* deletierten *S. cerevisiae*-Stamm gemessen. Die Pulse-Chase Analysen zeigen eine stufenweise Degradation von CTD*myc +MTX in einer *hul5Δ*-Mutante (Abbildung 5.16 B). Die verkürzten Zwischenprodukte (truncCTD*myc +MTX) akkumulieren bei ungefähr 63 kDa. Bereits nach 90 min liegt eine Stabilisierung von truncCTD*myc +MTX von etwa 20% (bezogen auf die Intensität der quantifizierten Signale von truncCTD*myc +MTX im Verhältnis zur Summe der Intensität der Produkte CTD*myc +MTX und truncCTD*myc +MTX zum Zeitpunkt t = 0 min) vor. Das Substrat CTD*myc ohne MTX zeigt keine Stabilisierung in einer *hul5*-Deletionsmutante und wird mit einer Kinetik wie im Wildtyp-Stamm degradiert (Abbildung 5.16 A).

Offenbar hat die Stärke/Festigkeit der Faltung der zytosolischen Domäne auf die Beteiligung der E4-Ligase Hul5 keinen Einfluss, da sie am Abbau von CTL*myc und CTD*myc +MTX beteiligt ist, jedoch nicht von CTG*.

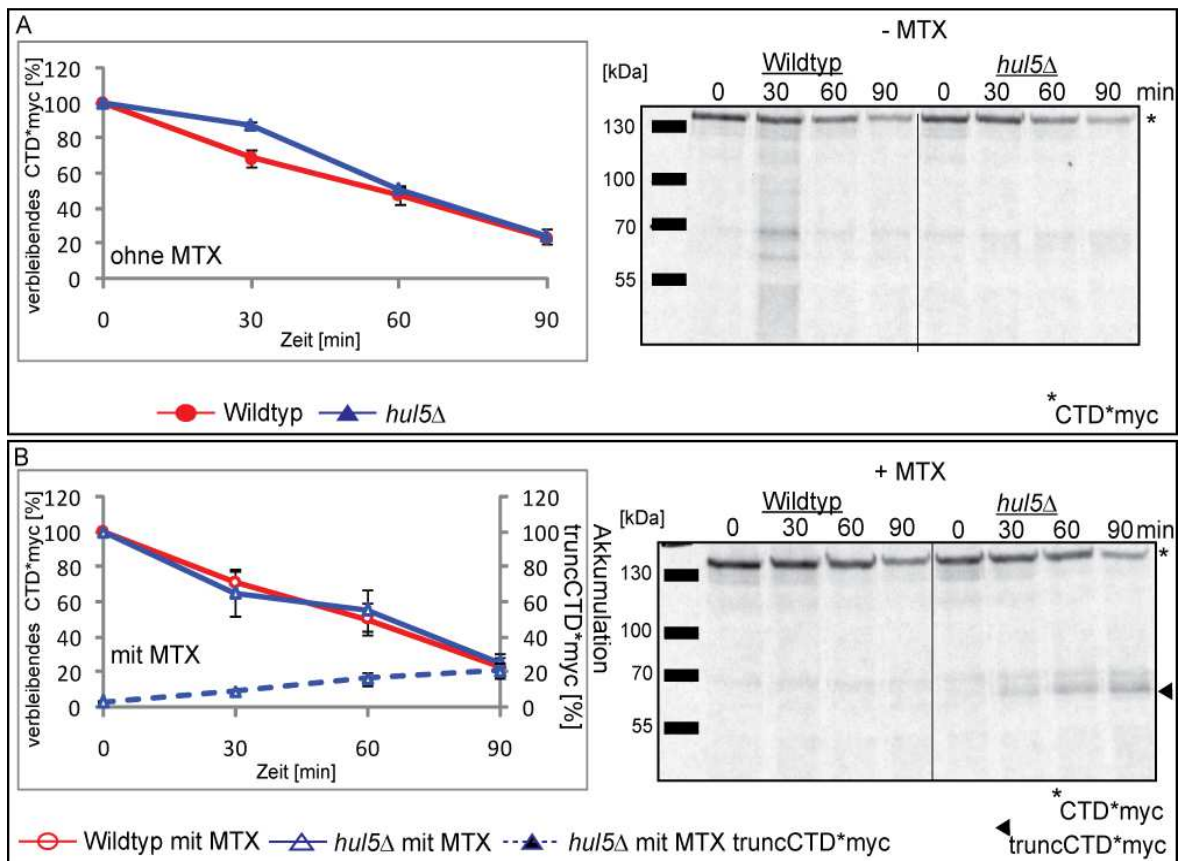


Abbildung 5.16: Der Abbau des ERAD-Substrats CTD*myc mit MTX erfolgt über ein definiertes Zwischenprodukt. Die Pulse-Chase Analysen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit dem Wildtypstamm YWO 636 (WT) und der Mutanten YWO 1320 (*hul5Δ*) durchgeführt. Diese Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. Das für CTD*myc codierende Plasmid PWO 1202 wurde transformiert. Beide *S. cerevisiae* Stämme sind für das Gen *PRC1* deletiert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen. Die Immunpräzipitation erfolgte mit myc-spezifischen Antikörpern. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. (A) Analyse ohne Zugabe von MTX. (B) Zeitgleich mit der Zugabe des radioaktiven ³⁵S-Methionins wurden 20 μM MTX hinzugefügt. Die Prozentangaben der "Akkumulation von truncCTD*myc" geben die Signalstärke der quantifizierten Signale von truncCTD*myc im Verhältnis zur Summe der Signalstärken des Substrats CTD*myc und truncCTD*myc zum Zeitpunkt t = 0 min des entsprechenden Stammes wieder.

5.2.10.2 Die katalytische Aktivität des E4-Enzyms Hul5 ist für den Abbau des ERAD-L-Substrats CTD*myc +MTX erforderlich

Crosas *et al.* (2006) zeigten, dass Hul5 durch seine katalytische Aktivität in der Lage ist, Oligoubiquitinketten *in vivo* und *in vitro* zu verlängern. Zusätzlich wird vermutet, dass Hul5 auch über eine nicht-katalytische Aktivität den proteasomalen Abbau von Substraten beeinträchtigen kann. In der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, ob die Ursache der Stabilisierung der angehäuften C-terminalen Fragmente des ERAD-L-Substrats CTD*myc +MTX in einem *HUL5* deletierten *S. cerevisiae* Stamm in einer fehlenden katalytischen Verlängerung der Ubiquitinketten zu finden ist.

Die katalytische Aktivität der HECT-Ubiquitin-Ligase Hul5 wurde durch einen Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum an der Position 878 von Cystein zu Alanin

eliminiert. Phoebe Zhang stellte ein Plasmid mit der entsprechenden Hul5 Mutation her (Crosas *et al.*, 2006). Das Degradationsverhalten von CTD*myc +MTX wurde in Gegenwart des punktmutierten, katalytisch inaktiven Hul5 mit Hilfe dieses Plasmids in einer *hul5*-Deletionsmutante getestet.

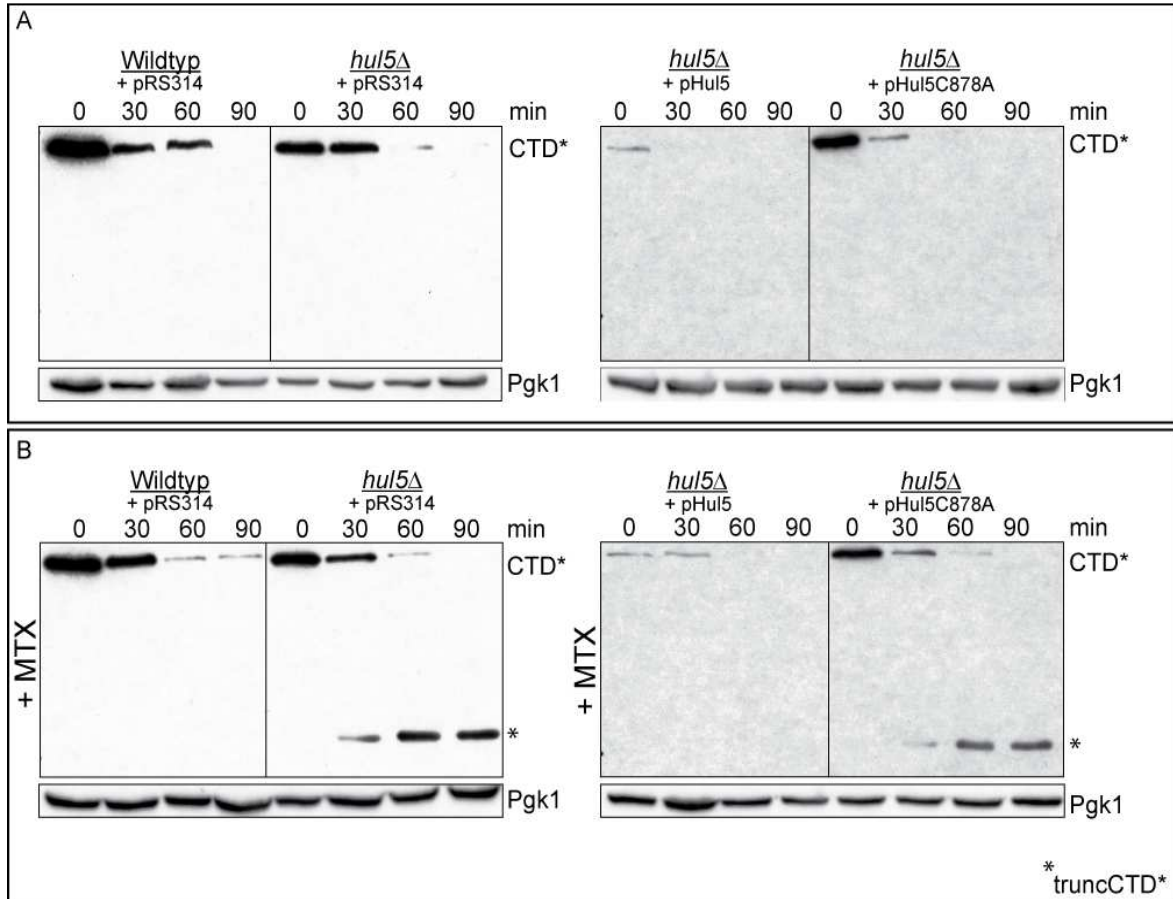


Abbildung 5.17: Für die vollständige Degradation von CTD* +MTX ist die katalytische Aktivität von Hul5 notwendig. Die Cycloheximid-Chase Experimente wurden mit dem Wildtyp Stamm YWO 636 und der YWO 1320 (*hul5Δ*) Mutante, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Beide Stämme besitzen eine *prc1Δ*-Mutation. Für die Expression des Substrats CTD* wurde das Plasmid PWO 1197 transformiert. Die Punktmutante *hul5*-C878A wurde vom Plasmid pSK11 exprimiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich das Plasmid pRS314, sowie das für Hul5 codierende Plasmid pSK10 verwendet. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Detektion im Western Blot erfolgte durch DHFR-spezifische Antikörper, die Ladekontrolle durch PGK-spezifische Antikörper. (A) Experiment ohne MTX. (B) Die Zellen wurden 30 min vor Zugabe des Cycloheximids mit 20 μ M MTX behandelt.

Das Degradationsverhalten von CTD*myc ohne MTX ist in Anwesenheit einer punktmutierten, katalytisch inaktiven Form von Hul5 in einem *HUL5* deletiertem *S. cerevisiae* Stamm nicht verändert (Abbildung 5.17 A). Das C-terminale Fragment truncCTD*myc +MTX akkumuliert in einer *hul5Δ*-Mutante, in der zusätzlich die punktmutierte, katalytisch inaktive Version von Hul5 exprimiert wird (Abbildung 5.17 B). Dies zeigt, dass die katalytische Verlängerung der Ubiquitinketten durch die HECT-E4-

Ligase Hul5 für den vollständigen Abbau des ERAD-L-Substrats CTD*myc +MTX erforderlich ist.

5.3 Ein neuer Ubr1-abhängiger ERAD-Weg

Fehlgefaltete sekretorische und membrangebundene Proteine werden im ER erkannt und ins Zytosol retrotransloziert. Dort werden sie polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Substratproteine werden abhängig von der Lokalisation ihrer Läsion von zwei ER-membranverankerten E3 Ubiquitin-Ligasen polyubiquitiniert (Hirsch *et al.*, 2009): Der3/Hrd1 und Doa10. Wie bereits in Kapitel 5.2.4 und in anderen Studien (Gnann *et al.*, 2004; Huyer *et al.*, 2004) gezeigt werden konnte, führt eine *der3/hrd1 doa10*-Doppeldeletion nicht zu einer vollständigen Stabilisierung der ERAD-Substrate. Diese Beobachtungen legen die Existenz eines "Reservesystems" nahe, das die endgültige Beseitigung der fehlgefalteten ERAD-Substrate unterstützt. Die kürzlich veröffentlichte Studie von Eisele und Wolf (2008) zeigte die Ubr1-abhängige Degradation des zytosolisch exprimierten Δ ssCL*myc (CPY* fusioniert an 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2) mit einem 13myc-Epitop markiert; dem Substrat fehlt die Signalsequenz, die für die normale Lokalisierung ins ER benötigt wird). Dies rückte die Idee in den Mittelpunkt, dass dieses Enzym, welches als *N-recognin* (engl.; E3) aus dem *N-end rule*-Weg bekannt ist (Bartel *et al.*, 1990; Varshavsky, 1996a), die Funktion einer Ubiquitin-Ligase des ERAD übernehmen könnte, wenn beide ER-lokalisierten E3-Ubiquitin-Ligasen fehlen.

5.3.1 ERAD ohne ER-Ubiquitin-Ligasen erfordert die Beteiligung von Ubr1

In Kapitel 5.2.4 wurde bereits beschrieben, dass das Substrat CTD* vollständig in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppelmutante stabilisiert wird (Abbildung 5.8 B), weshalb es in den weiteren Studien nicht mehr berücksichtigt wurde. Dagegen erfahren die Substrate CTG* und CTL*myc nur eine partielle Stabilisierung in *S. cerevisiae*-Zellen, die keine der kanonischen ER Ligasen mehr besitzen.

Mittels Pulse-Chase Experimenten sollte überprüft werden, ob eine zusätzliche *UBR1* Deletion in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppelmutante zu einer vollständigen Stabilisierung dieser beiden membrangebundenen ERAD-L-Substrate führt. Wie in Abbildung 5.18 zu sehen ist, komplettiert die zusätzliche Deletion von Ubr1 in einer *der3/hrd1 Δ doa10 Δ* -Mutante die Stabilisierung der Substrate und verhindert den Abbau vollständig. Dieser additive Effekt war für das ERAD-L-Substrat CTG* (Abbildung 5.18 A) prominenter als für CTL*myc (Abbildung 5.18 B). Interessanterweise erfolgte die

Degradation dieser Substrate in einer *ubr1*-Einfachdeletionsmutante mit der gleichen Kinetik wie in Wildtyp-Zellen, was darauf schließen lässt, dass der Ubr1-vermittelte Abbau beim Ausschalten der beiden kanonischen ER-Ligasen ein „Back up“-Mechanismus ist.

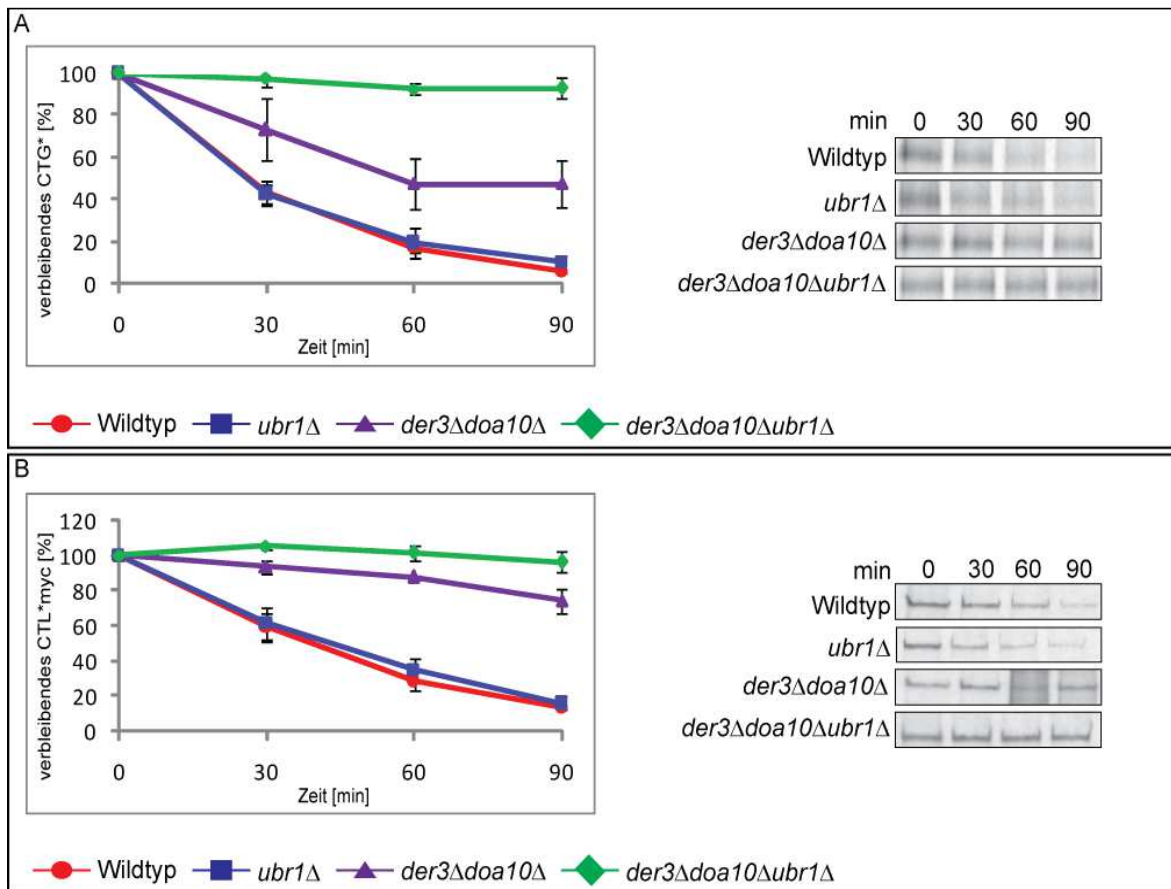


Abbildung 5.18: Komplettre Stabilisierung der membrangebundenen ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc bei fehlenden Ubiquitin-ER-Ligasen Der3/Hrd1, Doa10 und Ubr1. Die Kulturen YWO 1580 (WT), YFE2 (*ubr1*Δ), YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1731 (*der3Δdoa10Δubr1Δ*) wurden für die Analysen verwendet. Alle *S. cerevisiae* Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*, ausgenommen der Stamm YFE2, der *CPY** (*prc1-1*) exprimiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. (A) Die Zellen wurden mit für CTG* (PWO 621) codierenden Plasmiden transformiert. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet. (B) Für CTL*myc (PWO 1035) codierende Plasmide wurden transformiert und CTL*myc mit myc-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert.

Um ausschließen zu können, dass der additive Effekt der *ubr1*-Deletion auf den Abbau in *der3/hrd1Δ doa10Δ-S. cerevisiae* Zellen nicht auf der Verwendung von membrangebundenen ERAD-L-Substraten mit zytosolischen Domänen beruht, wurde der Einfluss von Ubr1 auch für lösliche (CPY*3HA) und membrangebundene ERAD-L-Substrate ohne zytosolische Domäne (CT*) untersucht. Das Ergebnis der Pulse-Chase Analyse in Abbildung 5.19 A zeigt, dass Ubr1 für die ERAD löslicher ERAD-L-Substrate wie CPY*3HA keine „Back up“ Ligase darstellt. Der Abbau des membrangebundenen ERAD-L-Substrats ohne zytosolische Domäne, CT*, wird in einer Tripelmutante

(*der3/hrd1Δ doa10Δ ubr1Δ*) gegenüber einer Doppelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ*) deutlich schneller abgebaut, jedoch nicht vollständig (Abbildung 5.19 B). Dies kann im Moment nicht erklärt werden. Daher kann angenommen werden, dass der additive Effekt der *ubr1*-Deletion in Abwesenheit der kanonischen ER-Ligasen nur auf die hier getesteten membrangebundenen ERAD-L-Substrate mit zytosolischen Domänen zutrifft.

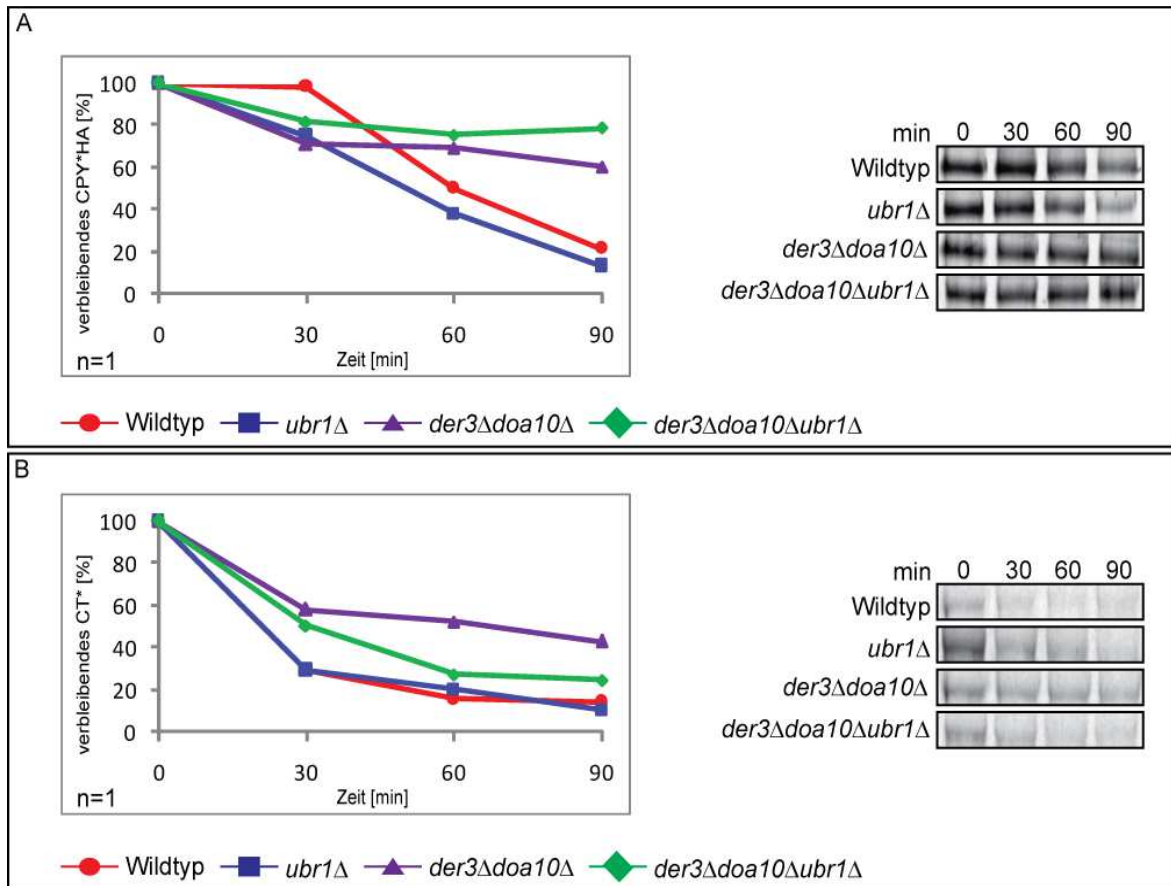


Abbildung 5.19: Das Fehlen der zytosolischen Ubiquitin-Ligase Ubr1 in *der3/hrd1Δ doa10Δ*-*S. cerevisiae*-Zellen hat keinen zusätzlichen Einfluss auf das Degradationsverhalten von löslichem CPY*3HA und membrangebundenen CT*. Für die Pulse-Chase Experimente wurden die Kulturen YWO 1580 (WT), YFE2 (*ubr1Δ*), YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1731 (*der3Δdoa10Δubr1Δ*) verwendet. Alle *S. cerevisiae* Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*, ausgenommen der Stamm YFE2, der für CPY* (*prc1-1*) codiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Es wurde jeweils nur ein Experiment, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. (A) Die Zellen wurden mit für CPY*3HA (PWO 885) codierenden Plasmiden transformiert. Für die Immunpräzipitation wurden gegen das HA-Epitop gerichtete Antikörper verwendet. (B) Für CT* (PWO 804) codierende Plasmide wurden transformiert und CT* mit CPY-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert.

5.3.2 Ubr1 wird nicht an die ER-Membran rekrutiert

Im vorangegangenen Kapitel 5.3.1 konnte gezeigt werden, dass die membrangebundenen ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc in Abwesenheit der beiden kanonischen E3-Ligasen der ER-Membran Ubr1-abhängig abgebaut werden. Von Ubr1, der E3-Komponente des *N-end rule*-Weges, ist bekannt, dass es direkt mit dem 26S Proteasom

interagiert (Xie und Varshavsky, 2000). Vorrangig sollte zunächst untersucht werden, ob Ubr1 in dem neu entdeckten Ubr1-abhängigen ERAD-Weg an die ER-Membran rekrutiert wird. Für diese Versuche wurde eine N-terminal mit einem FLAG-Epitop markierte Version von Ubr1 von einem Vektor exprimiert (Du *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2008). Die Expression von Flag-Ubr1 konnte nun durch die Detektion des Flag-Epitops nachgewiesen werden. Zelllysate der YFE 2 (*ubr1Δ*)- und YWO 1735 (*der3/hrd1Δ doa10Δ ubr1Δ*)-Kulturen wurden über Ultrazentrifugation in ihre lösliche (Überstand) und feste (Pellet) Fraktion getrennt und unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion im Western Blot aufbereitet. Mit einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörper wurde die Lokalisierung von Flag-Ubr1 im Western Blot detektiert.

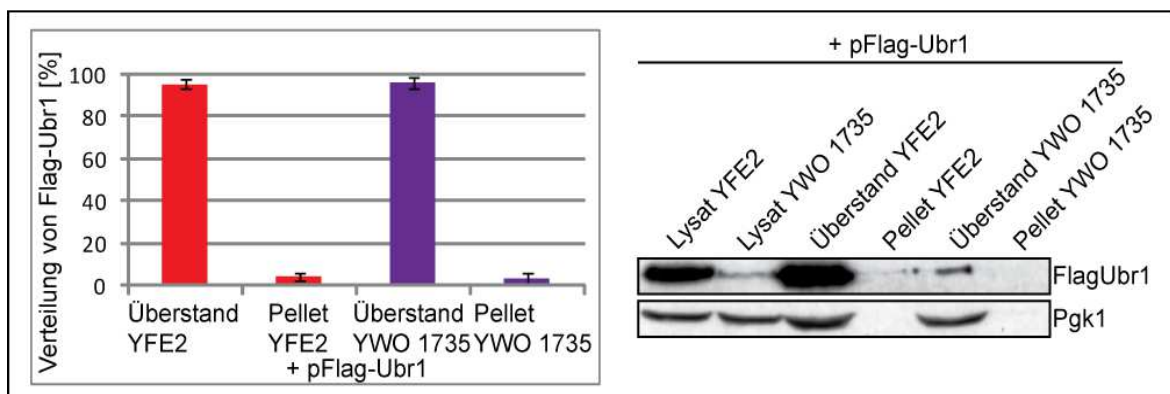


Abbildung 5.20: Flag-Ubr1 wird nicht an die ER-Membran rekrutiert. *S. cerevisiae* Zellen der Kulturen YFE2 (*ubr1Δ*) und YWO 1735 (*der3Δdoa10Δubr1Δ*) wurden mit dem für Flag-Ubr1 codierenden Plasmid PWO 1235 transformiert. Beide Kulturen exprimieren am *PRC1*-Locus lokalisiert punktmutiertes CPY* (*prc1-1*). Jeweils 100 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet und mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, zwei Mal fünf Minuten bei 400 xg und anschließend eine Stunde bei 100 000 xg in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die lösliche Fraktion (Überstand) wurde mit 50% TCA präzipitiert. Die unlösliche Fraktion wurde nochmals unter Zuhilfenahme eines Gewebehomogenisators gewaschen und ein weiteres Mal für eine Stunde bei 100 000 xg in einer Ultrazentrifuge pelletiert. Die Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und in einem Anti-Flag-Immunblot detektiert. Die Detektion des löslichen Proteins PGK diente zur Kontrolle der differentiellen Zentrifugation. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die entsprechenden Signale im Western Blot wurden mit dem Program ImageJ 1.41o quantifiziert. Die Prozentangaben der "Verteilung von Flag-Ubr1" geben die Signalstärken der quantifizierten Signale von Überstand und Pellet im Verhältnis zur Summe der Signalstärken von Überstand und Pellet des entsprechenden Stammes wieder.

Wie aus Abbildung 5.20 entnommen werden kann, ist Flag-Ubr1 nach Expression in den *S. cerevisiae*-Stämmen YFE 2 (*ubr1Δ*) und YWO 1735 (*der3/hrd1Δ doa10Δ ubr1Δ*) in keiner der Pellet-Fractionen detektierbar. Unter den experimentellen Bedingungen, die hier verwendet wurden, ist Ubr1 offensichtlich nicht an der ER-Membran lokalisiert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Bindung von Ubr1 an die Membran so fragil ist, dass es unter den Präparationsbedingungen abgelöst wird.

5.3.3 Die ERAD-L-Substrate bleiben bei inhibiertem Proteasom in der ER-Membran verankert

Um ausschließen zu können, dass der in Kapitel 5.3.2 beobachtete Effekt, dass Ubr1 möglicherweise nicht an die ER-Membran assoziiert ist, nicht darauf beruht, dass die Substrate CTG* und CTL*myc nicht mehr ER-membrangebunden vorliegen, wurde untersucht, wo diese ERAD-L-Substrate lokalisiert sind. Dazu musste das Proteasom inhibiert werden, um einen sofortigen Abbau der Substrate zu verhindern. Zellysate der YWO 1336- und YWO 1741-Kulturen wurden über Ultrazentrifugation in ihre lösliche (Überstand) und Pellet-Fraktion getrennt und unter denaturierenden Bedingungen für die Detektion im Western Blot aufbereitet. Bei der Detektion von CTG* wurden für den Western Blot anti-GFP Antikörper verwendet, während CTL*myc mit gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörpern detektiert wurde.

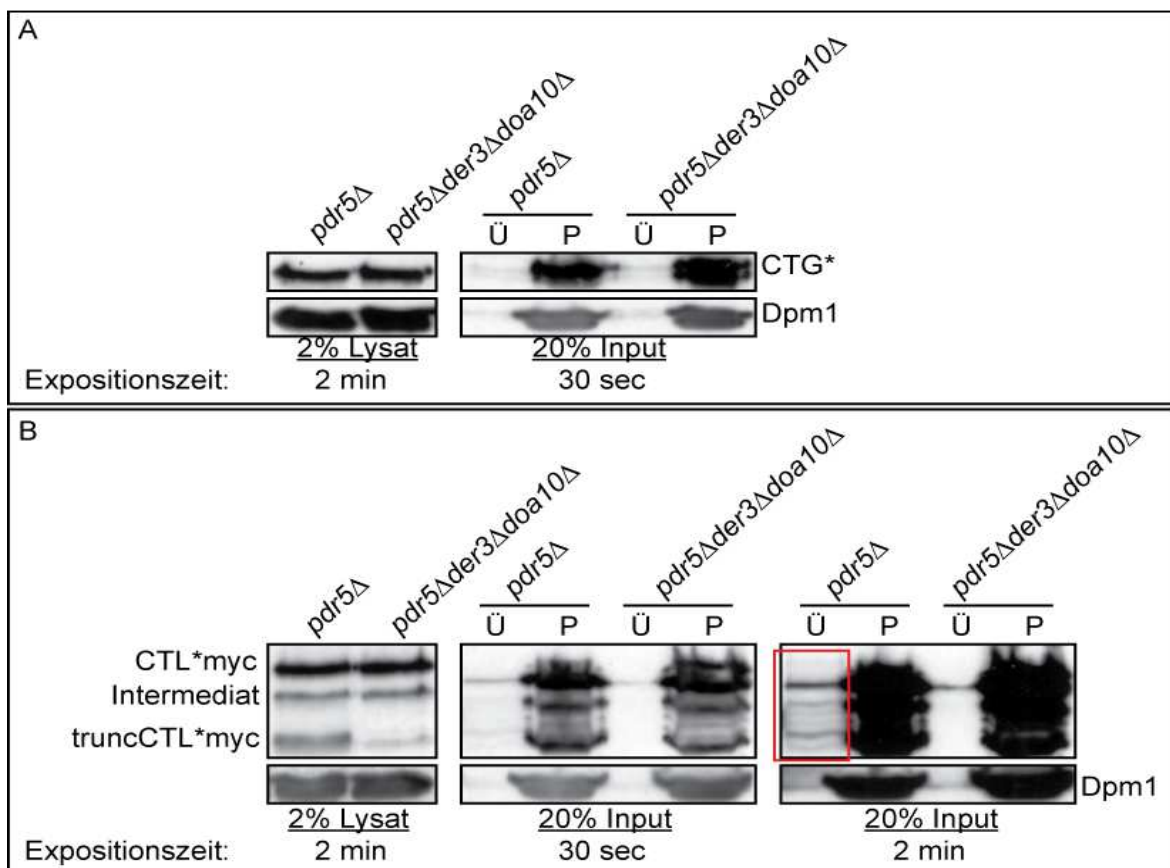


Abbildung 5.21: Die ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc verbleiben bei inhibiertem Proteasom in der ER-Membran. 100 OD₆₀₀ Zellen logarithmisch wachsender Hefezellen der *S. cerevisiae* Stämme YWO 1336 (*pdr5Δ*) und YWO 1741 (*pdr5Δder3Δdoa10Δ*), die eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1* besitzen, wurden geerntet. Das Proteasom wurde mit 150 μM MG132 inhibiert. Die Hefezellen wurden mit Glasperlen aufgebrochen, und zweimal bei 2000 xg zentrifugiert, um grobe Zellfragmente zu entfernen. Eine Probe des Lysats wurde mit 50% TCA gefällt. Das restliche Lysat wurde bei 100 000 xg für eine Stunde in einer Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand (Ü) wurde mit 50% TCA gefällt. Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde mit Hilfe eines Gewebehomogenisators gewaschen und erneut bei 100 000 xg für eine Stunde zentrifugiert. Das Pellet (P) wurde in Harnstoffpuffer aufgenommen und in einem SDS-Gel

aufgetrennt. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurden Dpm1-spezifische Antikörper verwendet. (A) Die *S. cerevisiae* Zellen wurden mit für CTG* (PWO 621) codierenden Plasmiden transformiert. Das Membranprotein wurde mit anti-GFP spezifischen Antikörpern detektiert. (B) Im Western Blot wurde das Fusionsprotein mit anti-myc Antikörpern detektiert. Das für CTL*myc codierende Plasmid PWO 1035 wurde transformiert. Um die im Zytosol angereicherten möglichen Ubiquitin-Fragmente von CTL*myc besser sichtbar zu machen, wurde die Expositionszeit erhöht. (rotes Rechteck).

Beide Substrate liegen in den Pelletfraktionen vor (Abbildung 5.21), sowohl in einem *S. cerevisiae* Stamm, bei dem nur das Proteasom inhibiert wurde (YWO 1336 (*pdr5Δ*)) als auch in einer Mutante (YWO 1741 (*pdr5Δ der3/hrd1Δ doa10Δ*)) bei Inhibierung des Proteasoms. Dies bedeutet, dass beide ERAD-L-Substrate auch im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg in der ER-Membran lokalisiert sind. Der größte Anteil von CTL*myc liegt in der Pelletfraktion vor. Bei längerer Exposition (2min) konnten für das ERAD-L-Substrat CTL*myc in *pdr5Δ*-Zellen im Überstand mehrere unterschiedlich große Fragmente detektiert werden (Abbildung 5.21 B, 2min). Eine Detektion dieser Fragmente in einer *pdr5Δ der3/hrd1Δ doa10Δ*-Mutante war nicht möglich, es könnte sich dabei eventuell um bereits polyubiquitinierte, zum Abbau markierte Proteine handeln.

5.3.4 Polyubiquitinierung des ERAD-L-Substrats CTG*

5.3.4.1 CTG* wird bei Abwesenheit der bekannten E3 Ligasen weiterhin polyubiquitiniert

Bei Fehlen von Ubr1 in Abwesenheit der beiden kanonischen ER-Ligasen der ER-Membran (Kapitel 5.3.1; Abbildung 5.18 A) wurde CTG* am markantesten stabilisiert, weshalb hauptsächlich mit diesem Substrat weiter gearbeitet wurde.

Die Mehrheit der ERAD-Substrate in *S. cerevisiae* wird von zwei E3-Ubiquitin-Ligasen, abhängig von der Topologie und der Lokalisierung der Fehlfaltung des Substrats, abgebaut (Hirsch *et al.*, 2009; Eisele *et al.*, 2010). Die E3-Ligase des ERAD-L-Weges, Der3/Hrd1, führt neben koordinierten Aktivitäten auf der luminalen Seite des ERs hauptsächlich die Polyubiquitinierung zum Abbau bestimmter Substrate auf der zytosolischen Seite durch (Mehnert *et al.*, 2010). Daher stellte sich die Frage, ob CTG* auch noch in einer Doppelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ*) und darüber hinaus auch in einer Tripelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ ubr1Δ*) polyubiquitiniert wird.

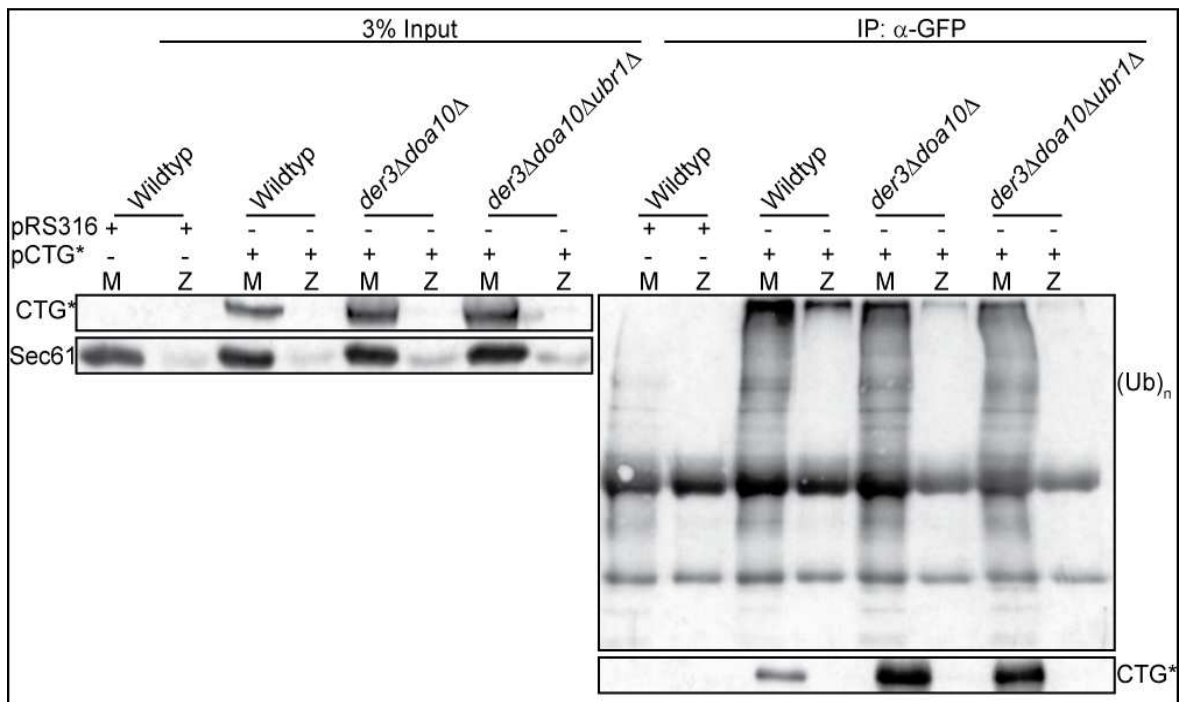


Abbildung 5.22: Ubiquitinierung von CTG* im Wildtypstamm sowie in den E3-Ligasen-Mehrfachmutanten. Die Polyubiquitinierungsexperimente wurden mit den Kulturen YWO 636 (WT), YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*), YWO 1731 (*der3Δdoa10Δubr1Δ*) und dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Alle diese *S. cerevisiae* Stämme besitzen eine *prc1Δ*-Mutation. Als Negativkontrolle wurde das Kontrollplasmid PWO 67 verwendet. Um eine Anreicherung an polyubiquitinierten Proteinen zu erhalten, wurden die Zellen mit 150 µg/OD₆₀₀ Zelleinheit Cycloheximid behandelt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit GFP-spezifischen Antikörpern. Für die Detektion im Western Blot wurden Ubiquitin-, GFP- und Sec61-spezifische Antikörper verwendet.

M: Membranfraktion Z: Zytosolfraktion

Nach Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation war polyubiquitiniertes CTG* nur in der Membranfraktion (M) detektierbar (Abbildung 5.22). CTG* wurde mit GFP-Antikörpern immunpräzipitiert und im Western Blot mit gegen Ubiquitin gerichtete Antikörper detektiert. Interessanterweise zeigte die Immunpräzipitation von CTG* keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Polyubiquitinierung in den unterschiedlichen Mutanten.

5.3.4.2 CTG* wird an der zytosolisch lokalisierten Domäne polyubiquitiniert

Nachdem im Kapitel 5.3.4.1 gezeigt werden konnte, dass das ERAD-L-Substrat CTG* weiterhin in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ ubr1Δ* Tripelmutante polyubiquitiniert wird, war es von besonderem Interesse zu untersuchen, an welcher Domäne die Fusionsproteine CTG* und CTL*myc polyubiquitiniert werden. Da der mutierte CPY-Anteil der Fusionsproteine, das Degradationsmotiv der Substrate, im ER-Lumen lokalisiert ist, wäre es vorstellbar, dass dieser wie bereits für CTL*myc gezeigt (Kohlmann *et al.*, 2008) ins Zytosol transloziert und anschließend polyubiquitiniert wird. Mittels Proteinase K-Experimenten sollte die Lokalisierung der Polyubiquitinierung der Fusionsproteine CTG* und CTL*myc untersucht werden. Um einen sofortigen Abbau der Substrate zu

verhindern, wurden ER-Vesikel bei inhibiertem Proteasom in *PDR5* deletierten *S. cerevisiae* Zellen isoliert. Ein großer Teil der Polyubiquitinierung von CTG* geht verloren, wenn die intakten Vesikel mit Proteinase K behandelt werden (Abbildung 5.23 A). Zeitgleich wird CTG* auf ein Protein verkürzt, das anhand der molekularen Masse dem ERAD-L-Substrat CT* entspricht und mit gegen CPY gerichteten Antikörpern detektiert werden kann (Abbildung 5.23 A). Erst die zusätzliche Behandlung mit dem Detergenz Triton® X-100 führt zu einem vollständigen Verdau von CTG*. Dies bedeutet, dass die Proteinanteile CPY* und Transmembrandomäne von CTG* geschützt im ER-Lumen lokalisiert sind und CTG* größtenteils auf der zytosolischen Seite an der GFP-Domäne polyubiquitiniert wird. Zur Kontrolle wurde das Experiment mit einem Kontrollplasmid pRS316 (Abbildung 5.23 B1) und DMSO (Abbildung 5.23 B2) durchgeführt.

Die Polyubiquitinierung von CTL*myc verschwindet vollständig, wenn die intakten Vesikel mit Proteinase K behandelt werden (Abbildung 5.23 C). Es wird kein verkürztes Protein gebildet, welches weder mit gegen das myc-Epitop oder gegen CPY gerichtete Antikörper detektierbar gewesen wäre (Abbildung nicht gezeigt). Daher lässt sich keine exakte Aussage über die Lokalisierung der Polyubiquitinierung von CTL*myc machen.

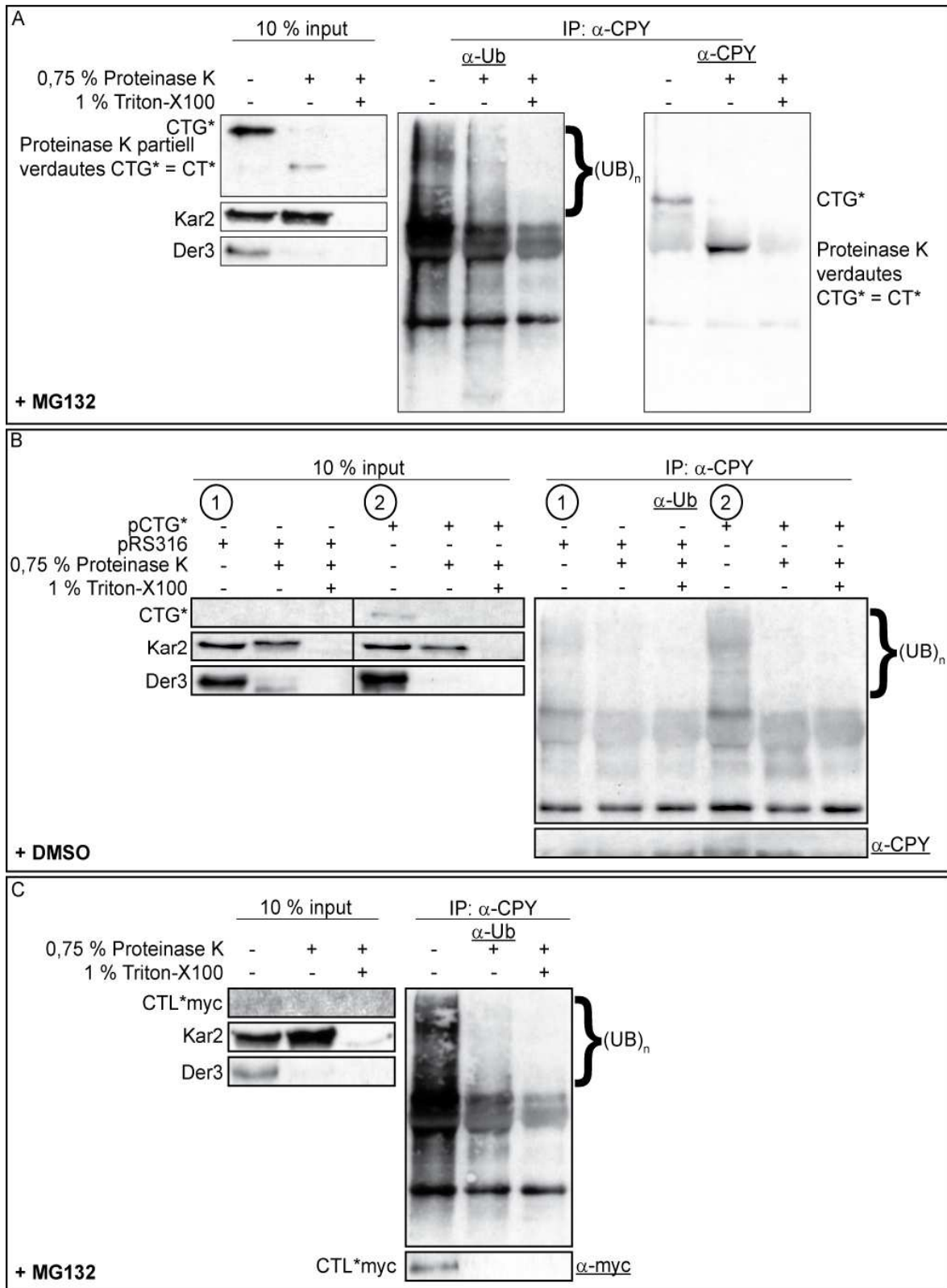


Abbildung 5.23: Polyubiquitinierung der ERAD-Substrate CTG* und CTL*myc. Die Proteinase K-Experimente wurden mit der Kultur YWO 1336 (*pdr5Δ*), die eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1* besitzt, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Um eine Anreicherung an polyubiquitinierten Proteinen zu erhalten, wurden die Zellen mit 150 μ g/OD₆₀₀ Zelleinheit Cycloheximid behandelt. Das Proteasom wurde unter Zugabe von 150 μ M MG132 inhibiert. Die Fusionsproteine wurden mit 1% SDS solubilisiert. Mit CPY-spezifischen Antikörpern wurden die Membranproteine präzipitiert. Intakte Mikrosomen wurden durch die Detektion von Kar2 mit anti-Kar2 spezifischen Antikörpern im Western

Blot überprüft. Zur Kontrolle eines vollständigen Verdaus durch die Proteinase K wurde Der3 mit anti-Der3 spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (A) Das für CTG* codierende Plasmid PWO 621 wurde transformiert. CPY- und Ubiquitin-spezifische Antikörper wurden zur Detektion im Western Blot verwendet. (Unterstrichene Antikörperangaben) (B1) Zur Kontrolle wurde das Plasmid pRS316 (PWO 67) transformiert. (B2) Es wurde mit der gleichen Kultur und Plasmid wie in (A) ein Versuch ohne Zugabe von MG132, aber mit dem Lösungsmittel DMSO, durchgeführt. (C) Es wurde das Plasmid CTL*myc (PWO 1035) verwendet. Ubiquitin- und myc-spezifische Antikörper wurden zur Detektion im Western Blot verwendet.

5.3.5 CTG* wird im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg proteasomal abgebaut

Eine zentrale Frage war, ob CTG* im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg weiterhin über das 26S Proteasom abgebaut wird. Aus den Pulse-Chase Experimenten in Abbildung 5.24 A ist ersichtlich, dass das 26S Proteasom im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg in die Degradation von CTG* involviert ist. Damit ausgeschlossen werden kann, dass die beobachteten Effekte auf das Lösungsmittel DMSO in dem der Proteasom-Inhibitor MG132 gelöst wurde, zurückzuführen sind, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem zu *pdr5Δ der3/hrd1Δ doa10Δ*-Mutantenzellen entweder DMSO oder MG132 zugegeben wurde.

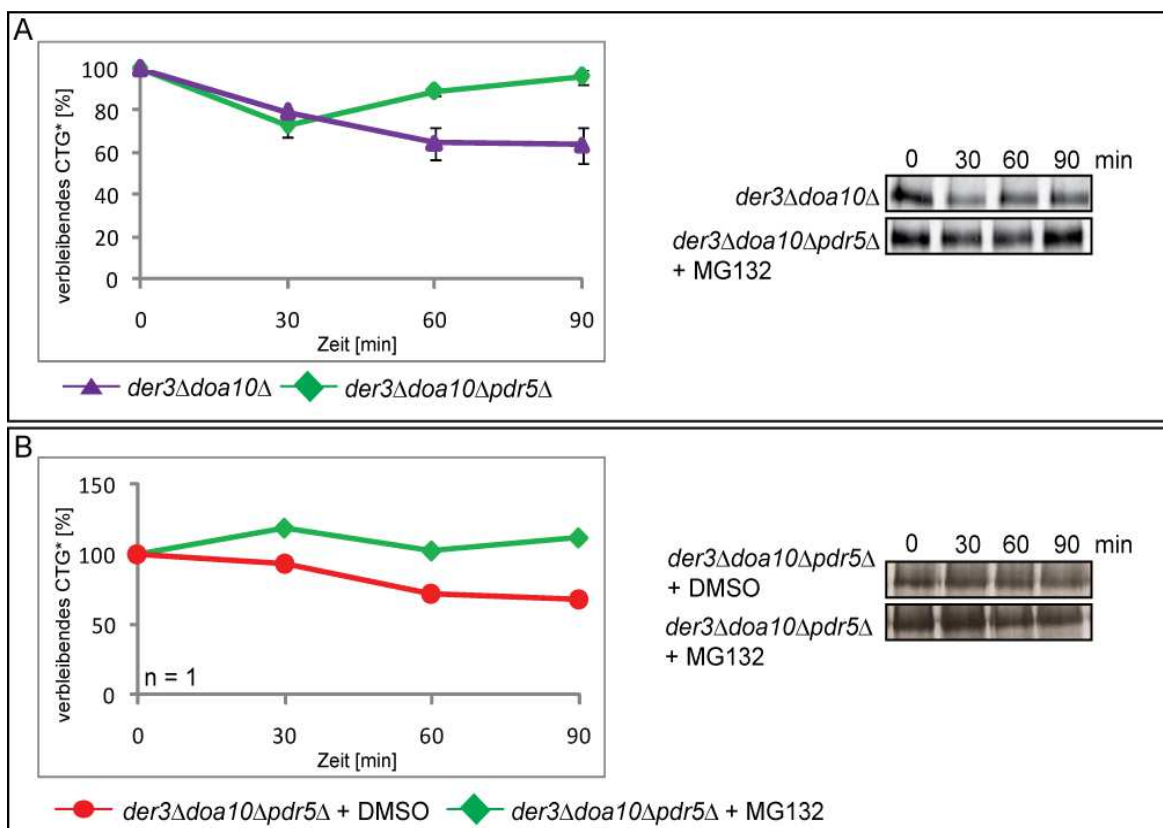


Abbildung 5.24: Bei Inhibierung des Proteasoms erfolgte eine Stabilisierung des Fusionsproteins CTG*. (A) Die Pulse-Chase Analysen wurden mit den *S. cerevisiae* Stämmen YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1840 (*der3Δdoa10Δpdr5Δ*) sowie dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Diese Stämme besitzen eine Deletion im *PRC1* Gen. Das Proteasom wurde mit 150 μM MG132 gelöst in DMSO in der Kultur YWO 1840 inhibiert. Die Proben wurden zu

den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte beschrieben. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet. (B) Um zu zeigen, dass das Lösungsmittel DMSO keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurde ein Pulse-Chase Experiment mit dem *S. cerevisiae* Stamm YWO 1840 durchgeführt, bei dem einmal 150 µM MG132 gelöst in DMSO und einmal nur DMSO hinzu gegeben wurde. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet.

Wie zu erwarten war, wird CTG* bei Inhibierung des Proteasoms (Zugabe von MG132) vollständig in einem *PDR5 DER3/HRD1 DOA10* deletierten *S. cerevisiae* Stamm stabilisiert (Abbildung 5.24 B, grüne Linie), während CTG* bei aktivem Proteasom (Zugabe von DMSO) verlangsamt abgebaut wird (Abbildung 5.24 B, rote Linie).

5.3.6 Der1 und Dfm1 beeinflussen den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg nicht

Im Kapitel 5.2.3 der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *DER1* in *S. cerevisiae* Zellen zu einem nur leicht verlangsamteten Abbau von CTG* führt (Abbildung 5.7 B; Taxis *et al.*, 2003), wohingegen CTL*myc vollständig stabilisiert wird (Abbildung 5.7 C). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Der1 Homolog Dfm1 (Hitt und Wolf, 2004a) marginal für den Abbau von CTG* in ERAD benötigt wird (Stolz *et al.*, 2010). Mit Hilfe von Pulse-Chase Experimenten konnte eine zusätzliche Beteiligung von Der1 und Dfm1 für CTG* in dem Ubr1-abhängigen ERAD-Weg ausgeschlossen werden (Abbildung 5.25 A). Weder einzeln (*der3/hrd1Δ doa10Δ der1Δ* oder *der3/hrd1Δ doa10Δ dfm1Δ*; grüne und orangene Linie) noch zusammen in einer Vierfachmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ der1Δ dfm1Δ*; blaue Linie) zeigen die Deletionen von *DER1* und *DFM1* einen weiteren Effekt in der Abbaukinetik von CTG*.

Es wurden auch Pulse-Chase Versuche mit dem ERAD-L-Substrat CTL*myc in den Mehrfachmutanten durchgeführt. Aus Abbildung 5.25 B ist ersichtlich, dass CTL*myc durch die zusätzliche Deletion von *DER1* und *DFM1* in einem *der3/hrd1Δ doa10Δ S. cerevisiae* Hintergrund nur geringfügig langsamer abgebaut wird als in Wildtyp-Zellen (blaue Linie). In den Mutanten (*der3/hrd1Δ doa10Δ der1Δ* oder *der3/hrd1Δ doa10Δ dfm1Δ*; grüne und orangene Linie) scheint die Stabilisierung von CTL*myc stärker ausgeprägt zu sein. Jedoch wird dieser Effekt in einer Vierfachmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ der1Δ dfm1Δ*; blaue Linie) wieder reduziert, so dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Vierfachmutante und einem *der3/hrd1Δ doa10Δ-S. cerevisiae* Stamm verbleibt.

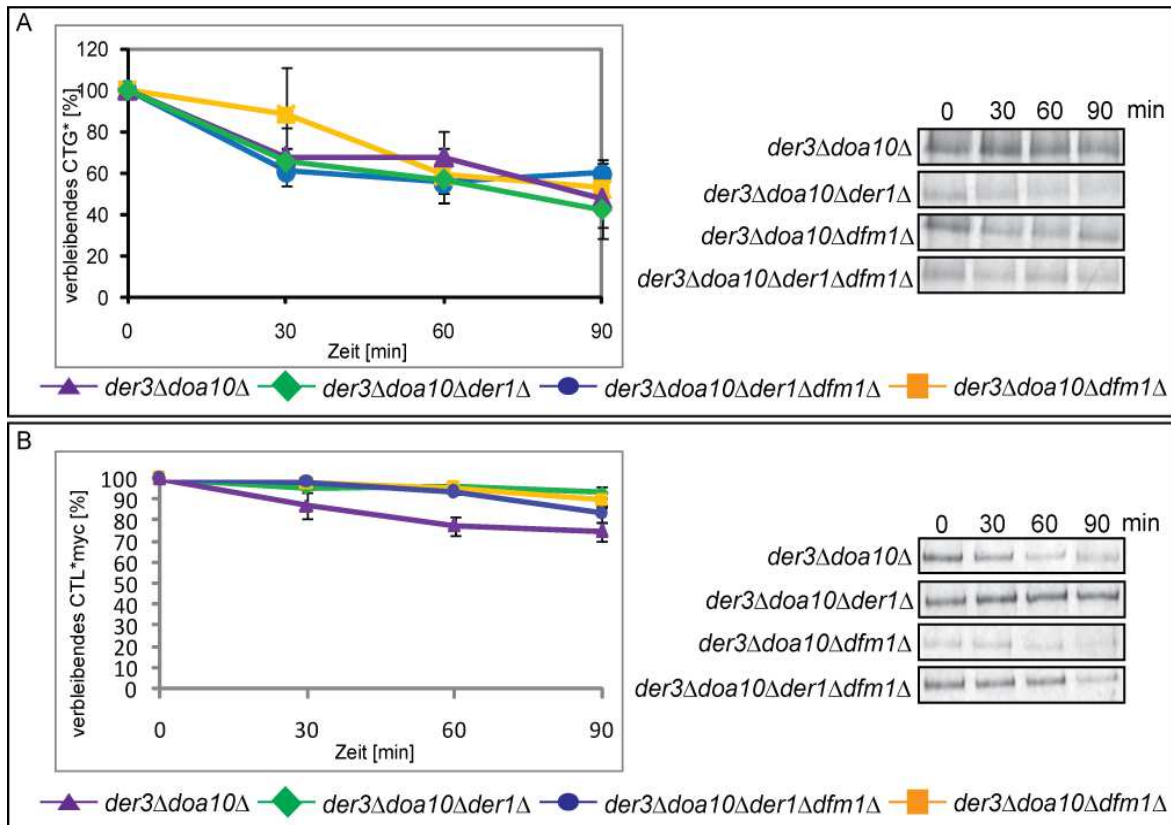


Abbildung 5.25: Der1 und Dfm1 sind nicht in den Ubr1-abhängigen Abbauweg der getesteten Substrate CTG* und CTL*myc involviert. Die Pulse-Chase Experimente wurden mit den Kulturen YWO 1527 (*prc1-1 der3Δ doa10Δ*), YWO 1744 (*prc1-1der3Δdoa10Δder1Δ*), YWO 1648 (*prc1-1 der3Δdoa10Δdfm1Δ*) und YWO 1746 (*prc1-1der3Δdoa10Δder1Δdfm1Δ*), wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Es wurden drei unabhängige Analysen durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte beschrieben. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an. (A) Das für CTG* codierende Plasmid PWO 621 wurde transformiert. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet. (B) Die Transformation erfolgte mit dem für CTL*myc codierenden Plasmid PWO 1035. Es wurde mit myc-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert.

5.3.7 Sec61 ist möglicherweise am Ubr1-abhängigen ERAD-Weg beteiligt

Obwohl ein direkter Beweis noch fehlt, gibt es unzählige Hinweise, dass Sec61, die porenförmige Untereinheit der ER-Protein-Import-Maschinerie, in den Export von ERAD-Substraten vom ER ins Zytosol involviert ist. Einerseits konnte das homologe Säugertierprotein Sec61 α bei Inhibierung des Proteasoms mit ERAD-Substraten koimmunpräzipitiert werden (Wiertz *et al.*, 1996). Andererseits konnte gezeigt werden, dass fehlgefaltete sekretorische Proteine deutlich verlangsamt in speziellen Mutantenversionen von *S. cerevisiae* Sec61 abgebaut werden, die jedoch für den Proteinimport funktional sind (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2008). Schließlich konnte kürzlich außerdem gezeigt werden, dass in *S. cerevisiae* Wildtypzellen Sec61 mit einem ERAD-Substrat und einer Komponente des RTKs koimmunpräzipitiert wird (Schäfer und Wolf, 2009). Die meisten dieser Ergebnisse unterstützen eine Rolle von

Sec61 im Proteinexport nur indirekt. Auch wäre eine generelle Beteiligung von Sec61 im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg nicht auszuschließen. Sec61 ist ein essentielles Protein, weshalb nur mit konditionellen Mutanten gearbeitet werden kann. Temperatursensitive Mutanten, die ein *sec61-2* Allel (Stirling *et al.*, 1992) tragen, können bei permissiver Temperatur (25 °C) wachsen. Bei restriktiver Temperatur (37 °C) fehlt ihnen jedoch die Sec61-Aktivität. Für die Cycloheximid-Chase Untersuchungen der CTG* Abbaukinetik wurden *S. cerevisiae* Zellen verwendet, die Deletionen für *DER3/HRD1* und *DOA10*, sowie ein temperatursensitives *sec61-2* Allel haben.

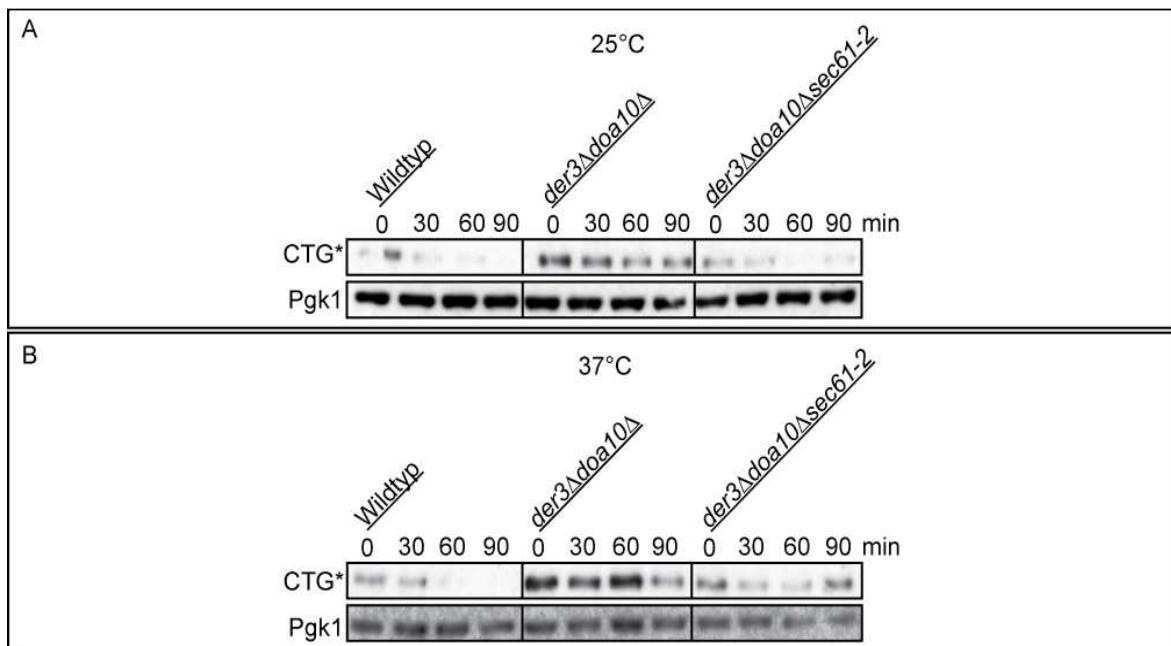


Abbildung 5.26: Sec61 wirkt eventuell im neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg mit. Der Abbau von CTG* wurde durch Cycloheximid-Chase Analysen in den Kulturen YWO 1089 (WT), YWO 1527 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1299 (*der3Δdoa10Δsec61-2*) sowie dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621 untersucht. Die drei *S. cerevisiae* Stämme haben alle eine Punktmutation im *PRC1* Gen (*prc1-1*). Um die Proteinbiosynthese zu inhibieren, wurden 1,5 mg CHX/10 OD₆₀₀ Zellen hinzugegeben. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit GFP- und PGK-spezifischen Antikörpern. (A) Die Zellen wurden bei 25 °C angezogen und weiterverarbeitet. Die Proben wurden 20 min nach Zugabe von CHX entnommen. (B) Die Zellen wurden bei 25 °C angezogen und nach Zugabe von CHX für 20 min auf 37 °C umgesetzt, bevor Zeitproben entnommen wurden.

Bei permissiver Temperatur ist der Abbau von CTG* in einer Doppelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ*) und Tripelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ sec61-2*) im Vergleich mit Wildtyp-Zellen verlangsamt (Abbildung 5.26 A). Unter restriktiven Bedingungen stabilisiert CTG* in einer Tripelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ sec61-2*) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen und einer Doppelmutante (*der3/hrd1Δ doa10Δ*) über 90 min (Abbildung 5.26 B). Da es sich hierbei um qualitative Daten handelt, kann eine eindeutige Aussage über die Beteiligung von Sec61 im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg zu diesem Zeitpunkt nicht gemacht werden.

5.3.8 Cdc48 wird nicht im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg von CTG* benötigt

Wie in Kapitel 5.2.8 bereits erwähnt, wirkt der Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex bei der Retrotranslokation von ERAD-Substraten ins Zytosol entscheidend mit (Ye *et al.*, 2001; Bays *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Nakatsukasa *et al.*, 2008; Stolz *et al.*, 2011). Mit Hilfe von Pulse-Chase Experimenten sollte nun untersucht werden, ob Cdc48 auch in den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg involviert ist.

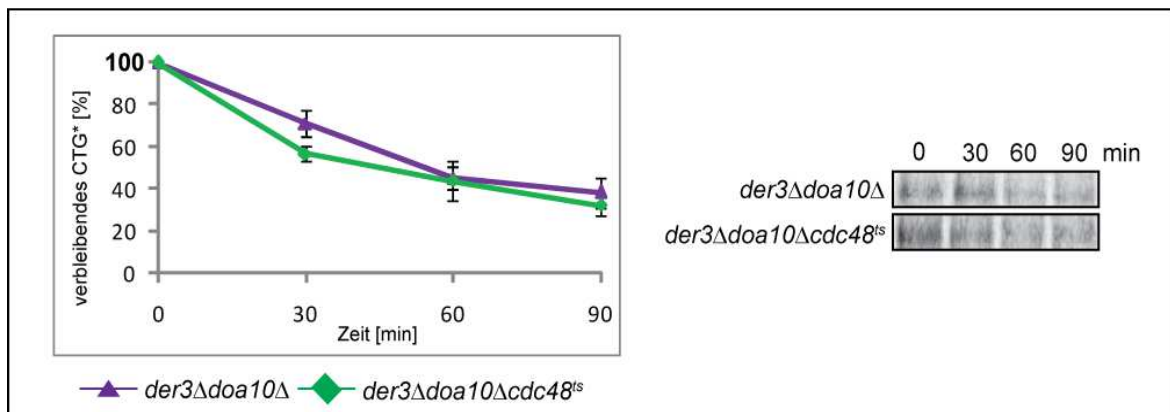


Abbildung 5.27: Cdc48 ist am neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg von CTG* nicht beteiligt. Die Pulse-Chase Experimente wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit den Kulturen YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1803 (*der3Δdoa10Δcdc48^{ts}*) durchgeführt, in die das für CTG* codierende Plasmid PWO 621 transformiert wurde. Die *S. cerevisiae* Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet. Die *S. cerevisiae* Zellen wurden nach dem metabolischen Markieren auf 37 °C umgesetzt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Im Diagramm sind die Mittelwerte beschrieben. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an.

Unter restriktiven Bedingungen konnte kein verlangsamter Abbau von CTG* in *der3/hrd1Δ doa10Δ-S. cerevisiae* Zellen mit der konditionalen *cdc48^{T413R}*-Mutation beobachtet werden (Abbildung 5.27). CTG* wird wie in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ*-Doppelmutante abgebaut, was bedeutet, dass Cdc48 nicht am retrograden Transport von CTG* im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg beteiligt ist.

5.3.9 Ubx2 ist eventuell nicht in den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg involviert

Ubx2 ist als ER-Membranprotein bekannt, dessen beide Termini ins Zytosol ragen (Schuberth und Buchberger, 2005), und das Cdc48 über seine UBX Domäne an die Membran des ER bindet. Es wurde in einem Komplex mit Cdc48-Ufd1-Npl4 gefunden (Schuberth *et al.*, 2004; Neuber *et al.*, 2005). Ausserdem ist Ubx2 in der Lage, ubiquitinierte Proteine *in vivo* zu binden. Eine Involvierung des Ubx2 Proteins in die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Degradation konnte nachgewiesen werden

(Decottignies *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 2004; Neuber *et al.*, 2005). Die Hauptaufgabe von Ubx2 scheint die Rekrutierung von Cdc48 an die ER Membran zu sein, wo es anschließend für den Kontakt zwischen Substrat, E3-Ligasen und anderen ERAD-Komponenten sorgt (Schubert und Buchberger, 2005; Neuber *et al.*, 2005). Mittels Cycloheximid-Chase Experimenten sollte überprüft werden, ob Ubx2 im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg mitwirkt.

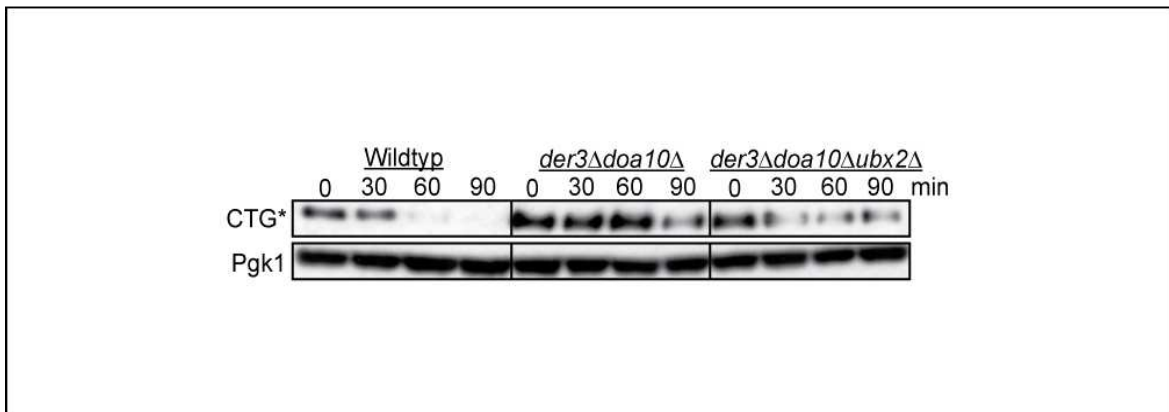


Abbildung 5.28: Ubx2 ist nicht in den neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg involviert. Der Abbau von CTG* wurde durch Cycloheximid-Chase Analysen in den Kulturen YWO 636 (WT), YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1814 (*der3Δdoa10Δubx2Δ*) sowie dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621, wie im Methodenteil beschrieben, untersucht. Diese Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion im *PRC1* Gen. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit GFP- und PGK-spezifischen Antikörpern. Da der 'steady state level' von CTG* in den Mehrfachmutanten signifikant höher war, wurden unterschiedliche Probenvolumina aufgetragen, um annähernd vergleichbare Proteinkonzentrationen zu erhalten (Wildtyp: 7 μ l Mehrfachmutanten: 4 μ l).

Aus Abbildung 5.28 ist ersichtlich, dass CTG* in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ ubx2Δ*-Tripelmutante über 90 min abgebaut wird. Da es sich hierbei um qualitative Daten handelt, kann eine eindeutige Aussage über die Beteiligung von Ubx2 im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg zu diesem Zeitpunkt nicht gemacht werden.

5.3.10 Das Hsp40-Co-Chaperon Hlj1 hat einen direkten Einfluss auf den neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg

Die Hefe *S. cerevisiae* exprimiert 22 Gene (Walsh *et al.*, 2004), die für Proteine mit einem DnaJ Domänen Motiv (Constanzo *et al.*, 2001) codieren. Darunter befindet sich auch das Hsp40-Co-Chaperon Hlj1, welches in der ER-Membran verankert ist und bei der ERAD von integralen Membranproteinen mitwirkt (Beilharz *et al.*, 2003; Huyer *et al.*, 2004; Youker *et al.*, 2004). Bereits 2003 konnten Taxis *et al.* einen Defekt im Abbau von CTG* in *HLJ1* deletierten *S. cerevisiae* Zellen beobachten. Wenn der Fakt, dass Hlj1 ein Co-Chaperon der Hsp70-Familie ist und die Tatsache berücksichtigt wird, dass CTG* in Wildtyp-Zellen Ssa1-abhängig degradiert wird (siehe Kapitel 5.2.5 und Taxis *et al.*, 2003), stellt sich die Frage, ob Hlj1 auch im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg erforderlich ist.

Zur Untersuchung des Abbaus von CTG* wurde eine Tripelmutante verwendet, bei der neben den Genen *DER3/HRD1* und *DOA10* auch *HLJ1* deletiert war.

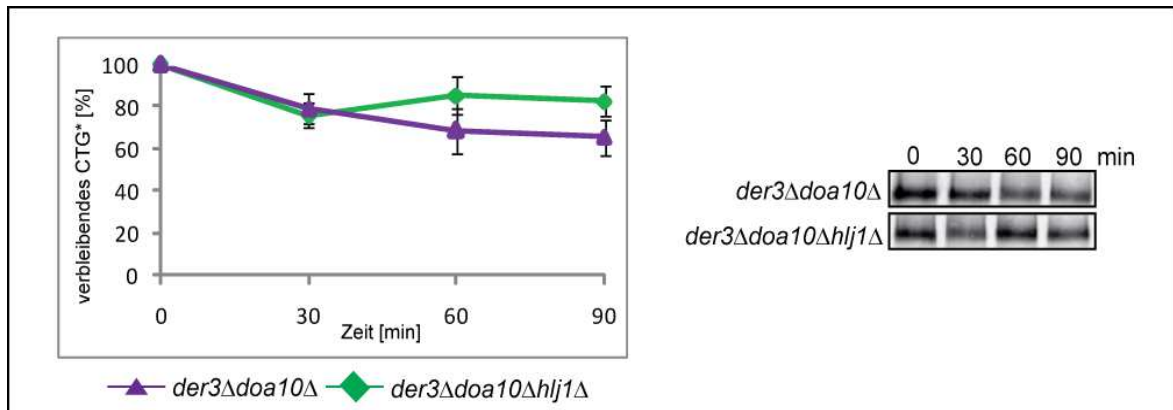


Abbildung 5.29: Hlj1 ist am neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg beteiligt. Pulse-Chase Experimente wurden mit den Kulturen YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1795 (*der3Δdoa10Δhlj1Δ*) sowie mit dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die *S. cerevisiae* Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Es wurden drei unabhängige Experimente erstellt. Im Diagramm sind die Mittelwerte dargestellt. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet.

Mittels Pulse-Chase Experimenten konnte eine signifikante Retardation der CTG* Degradation in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ hlj1Δ*-Mutante gegenüber einer *der3/hrd1Δ doa10Δ*-Doppelmutante beobachtet werden (Abbildung 5.29). Dies legt den Schluss nahe, dass der Hsp70-Hsp40-Komplex auch in den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg involviert ist.

5.3.11 E2-Proteine, die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme

Die Beseitigung von fehlgefalteten Proteinen unterliegt einem selektiven Prozess, für den die Markierung der Substrate mit Polyubiquitinketten Voraussetzung ist (Hershko und Ciechanover, 1998). Die Mehrheit der ERAD-Substrate wird durch das Zusammenspiel von E2-konjugierende Enzyme und E3-Ligasen ubiquitiniert. Dabei katalysieren die E2's den Transfer von Ubiquitin von einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) auf den E3-Substrat-Komplex und werden als Helferproteine in der Substraterkennung betrachtet (Elsasser und Finley, 2005).

Im Hefegenom von *S. cerevisiae* codieren 13 Gene für die Expression von E2-Enzymen (Ye und Rape, 2009.) Im Falle von ERAD-L-Substraten erfolgt die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf das Substrat vor allem über die E2-Enzyme Ubc1 und Ubc7 (Taxis *et al.*, 2003; Friedländer *et al.*, 2000; Hiller *et al.*, 1996). Bei ERAD-C-Substraten, wie dem zwölf Transmembran durchspannenden ABC Transporter Ste6*, werden

dagegen die E2-Enzyme Ubc6 und Ubc7 benötigt (Nakatsukasa *et al.*, 2008; Huyer *et al.*, 2004). Indessen sind Ubc4 und Ubc5 für die meisten Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbauprozesse von zytosolischen kurzlebigen und faltungsdefekten Proteinen erforderlich (Reiss und Hershko, 1990; Seufert und Jentsch, 1990). Ubc2, das auch als Rad6 bekannt ist (Jentsch *et al.*, 1987), ist essentiell für die Degradation von *N-end rule*-Substraten (Dohmen *et al.*, 1991a)

5.3.11.1 Das Ubiquitin-konjugierende E2-Enzym Ubc2

Die Deletion von *UBC2* führte zu Defekten in der DNA Reparatur, induzierter Mutagenese, Sporulation, Regulation der Retrotransposon Transposition und der Zellzykluskontrolle (Cox und Parry, 1968; Lawrence *et al.*, 1974; Game *et al.*, 1980; Montelone *et al.*, 1981; Kupiec und Simchen, 1984; Reynolds *et al.*, 1985; Borts *et al.*, 1986; Friedberg, 1988; Morrison *et al.*, 1988; Sung *et al.*, 1988; Goebel *et al.*, 1988; Picologlou *et al.*, 1990; Madura *et al.*, 1990). Zwei weitere Ergebnisse gaben Aufschluss darüber, dass Ubc2 in den *N-end rule*-Weg involviert ist. Einerseits konnte gezeigt werden, dass ein Ubr1-Ubc2-Komplex die Expression von Ubr1 durch die Veränderung der metabolischen Stabilität seiner mRNA reguliert (Madura *et al.*, 1993). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass Ubc2 auch als *N-end rule*-vermittelndes Ubiquitin-konjugierendes Enzym in Extrakten von Retikulozyten aus Kaninchen fungieren kann (Sung *et al.*, 1991). Ausserdem konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass das Ubiquitin-konjugierende E2-Enzym Ubc2 physikalisch mit Ubr1, der E3-Ligase des *N-end rule*-Weges, assoziiert (Dohmen *et al.*, 1991a).

Diese verschiedenen Beobachtungen könnten dafür sprechen, dass es sich bei dem E2-Protein Ubc2 auch um das Ubiquitin-konjugierende Enzym handelt, welches gemeinsam mit der E3-Ligase Ubr1 im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg agiert. Eine *der3/hrd1Δ doa10Δ ubc2Δ*-Mutante müsste dementsprechend den gleichen Defekt in der Degradation von CTG* aufweisen wie die dreifach Deletion von *DER3/HRD1*, *DOA10* und *UBR1* (Abbildung 5.18 A). Durch Pulse-Chase Experimente mit der *der3/hrd1Δ doa10Δ ubc2Δ*-Mutante und dem Substrat CTG* sollte überprüft werden, ob es sich bei Ubc2 tatsächlich um das spezifisch mit Ubr1 agierende Ubiquitin-konjugierende Enzym im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg handelt. Wie aus Abbildung 5.30 ersichtlich ist, wird CTG* nicht wie erwartet in einer *der3/hrd1 doa10 ubc2*-Deletionsmutante stabilisiert. CTG* wird in der Tripelmutante, wie im *der3/hrd1Δ doa10Δ*-Kontrollstamm, abgebaut. Offensichtlich fungiert im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg Ubc2 nicht als Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym.

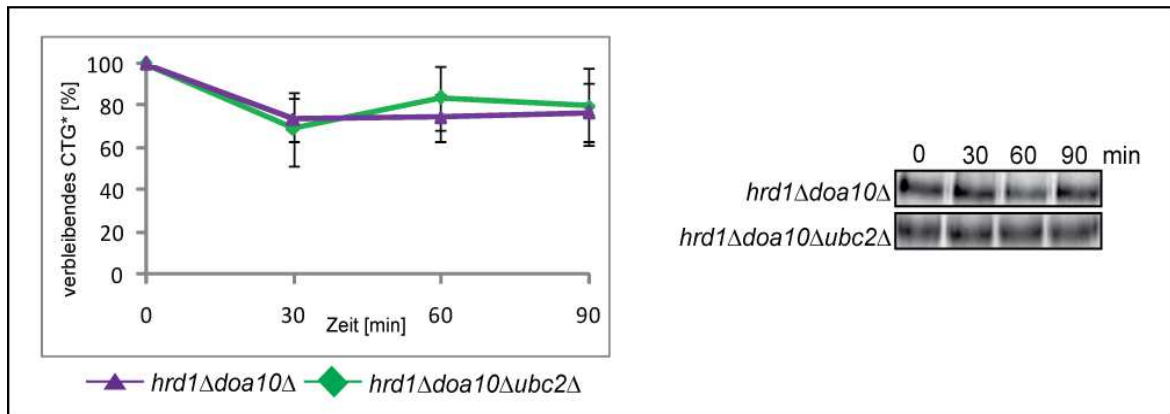


Abbildung 5.30: Ubc2 ist nicht das konjugierende E2 im Ubr1-abhängigen „Back up“-Weg. Der Abbau von CTG* wurde mittels Pulse-Chase Analysen in den Kulturen YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1812 (*der3Δdoa10Δubc2Δ*), die mit dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621 transformiert wurden, untersucht. Die *S. cerevisiae* Stämme besitzen eine zusätzliche Deletion des Gens *PRC1*. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Es wurden drei unabhängige Experimente erstellt. Im Diagramm sind die Mittelwerte beschrieben. Die Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet.

5.3.11.2 Die Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme Ubc6 und Ubc7

Im vorangegangenen Kapitel 5.3.11.1 wurde davon ausgegangen, dass Ubc2 das Ubiquitin-konjugierende Enzym ist, da Ubr1 in den neuen ERAD-Weg involviert ist (Kapitel 5.3.1) und es nachgewiesen werden konnte, dass Ubc2 mit Ubr1 interagiert (Dohmen *et al.*, 1991a). Für den Abbau von CTG*, einem ERAD-L-Substrat, konnte jedoch die Beteiligung von Ubc6 und Ubc7 beobachtet werden (Taxis *et al.*, 2003). Daher sollte als nächstes mittels Pulse-Chase Experimenten eine mögliche Rolle von Ubc6 und Ubc7 im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-Weg untersucht werden.

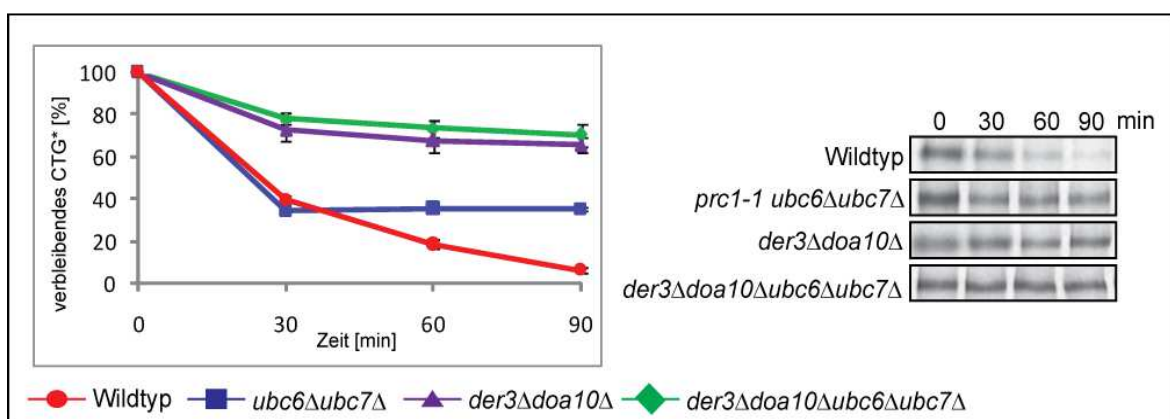


Abbildung 5.31: Die konjugierenden E2's Ubc6 und Ubc7 sind nicht in den neuen Ubr1-abhängigen Abbauweg involviert. Die Erstellung der Abbaukinetik mittels Pulse-Chase Experimenten erfolgte mit den Kulturen YWO 636 (WT), YWO 640 (*prc1-1 ubc6Δubc7Δ*), YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*) und YWO 1817 (*der3Δdoa10Δubc6Δubc7Δ*) sowie dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621. Die Kulturen YWO 636, YWO 1528 und YWO 1817 besitzen eine Deletion im *PRC1* Gen. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Es wurden drei unabhängige Experimente erstellt. Im Diagramm sind die Mittelwerte beschrieben. Die

Fehlerbalken geben die entsprechende Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an. Für die Immunpräzipitation wurden CPY-spezifische Antikörper verwendet.

Der Abbau von CTG* ist in *UBC6 UBC7* deletierten *S. cerevisiae* Zellen erheblich gestört (Abbildung 5.31, blauer Graph). Jedoch offenbart die Analyse, dass in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ ubc6Δ ubc7Δ*-Mutante keine Stabilisierung des ERAD-L-Substrats CTG* im Vergleich zu einem *der3/hrd1Δ doa10Δ*-Kontrollstamm mehr erfolgt (Abbildung 5.31, grüne Linie). Keines der untersuchten Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme Ubc2, Ubc6 oder Ubc7 sind am Ubr1-abhängigen ERAD-Weg beteiligt. Offenbar übernimmt im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg ein hier noch nicht identifiziertes E2-Protein die Funktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms.

5.3.11.3 Polyubiquitinierung von CTG*

Die Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme übertragen direkt oder indirekt über E3-Ligasen aktiviertes Ubiquitin auf das Substrat (Pickart und Eddins, 2004). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass weder das Ubr1-assoziierte E2-Enzym Ubc2 (Dohmen *et al.*, 1991a; Abbildung 5.30), noch die am Abbau von ERAD-L-Substraten beteiligten E2-Enzyme Ubc6 und Ubc7 (Taxis *et al.*, 2003; Friedländer *et al.*, 2000; Hiller *et al.*, 1996; Abbildung 5.32, grüne Linie) Defekte im Abbau von CTG* auslösen. Anhand weiterer biochemischer Analysen sollte die Beteiligung der genannten E2-Proteine in den Ubr1-abhängigen ERAD-Weg untersucht und kontrolliert werden.

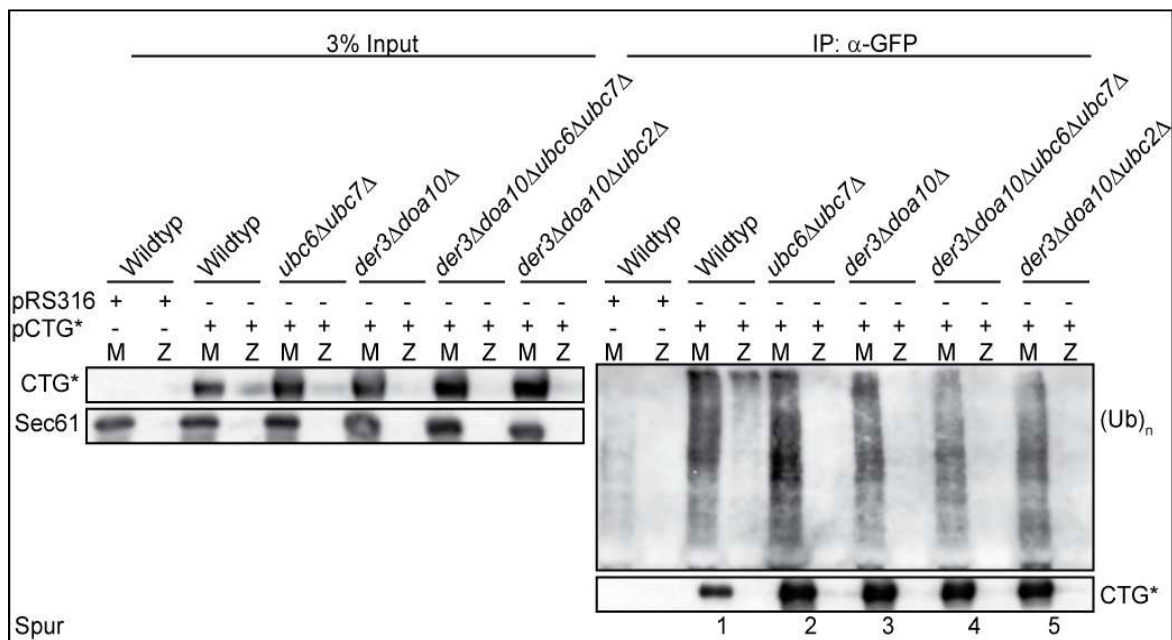


Abbildung 5.32: Polyubiquitinierung des Membranproteins CTG* in den E2-Mehrfachmutanten. Die Polyubiquitinierungsexperimente wurden mit den Kulturen YWO 636 (WT), YWO 640 (*prc1-1ubc6Δubc7Δ*), YWO 1528 (*der3Δdoa10Δ*), YWO 1817 (*der3Δdoa10Δubc6Δubc7Δ*), YWO 1812 (*der3Δdoa10Δubc2Δ*) und dem für CTG* codierenden Plasmid PWO 621, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die Kulturen YWO 636, YWO 1528, YWO 1817 und YWO 1812 besitzen eine zusätzliche

Deletion des Gens *PRC1*. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid PWO 67 verwendet. Um eine Anreicherung an polyubiquitinierten Proteinen zu erhalten, wurden die Zellen mit 150 µg/OD₆₀₀ Zelleinheit Cycloheximid behandelt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit GFP-spezifischen Antikörpern. Für die Detektion im Western Blot wurden Ubiquitin-, GFP- und Sec61-spezifische Antikörper verwendet. M: Membranfraktion Z: Zytoplastfraktion

Es war von besonderem Interesse, die Menge an polyubiquitiniertem Material zu überprüfen, die in Abwesenheit der E2-Enzyme Ubc2, Ubc6 und Ubc7 an CTG* gebunden wird und diese Menge mit der des *der3/hrd1Δ doa10Δ*-Kontrollstamms zu vergleichen. Mit polyklonalem GFP-Antikörper wurde in Hefeextrakten nach Ultrazentrifugation sowohl in der zytoplasmischen Fraktion als auch in der Membranfraktion CTG* immunpräzipitiert und Ubiquitin im Western Blot detektiert. Membranproteine wurden zuvor mit 1% SDS aus den Mikrosomen solubilisiert. In Abbildung 5.32 ist kein Unterschied an polyubiquitiniertem Material, welches mit CTG* zusammen immunpräzipitiert wurde, zwischen den verwendeten YWO1528-, YWO1817- und YWO1812-Kulturen zu erkennen. Dies bestätigt die erhaltenen Pulse-Chase Ergebnisse (Abbildung 5.30 und 5.31, grüne Linie), die zeigten, dass offenbar keine der untersuchten Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme Ubc2, Ubc6 oder Ubc7 am Ubr1-abhängigen ERAD-Weg beteiligt sind. Die getesteten E2-Enzyme Ubc2, Ubc6 und Ubc7 scheinen keinen Einfluss als Ubiquitin-konjugierende E2-Enzyme im Ubr1-abhängigen ERAD-Weg zu haben. Im direkten Vergleich der Mengen an polyubiquitiniertem Material wird aus Abbildung 5.32 deutlich, dass die E3-Ligasen Der3/Hrd1 und Doa10 beträchtlich zur Polyubiquitinierung von CTG* beitragen (Vergleiche Spur 1 + 2 mit Spur 3, 4 + 5). Dennoch wird CTG* beim Fehlen der E3-Ligasen Der3/Hrd1 und Doa10, sowie deren E2-Enzymen Ubc6, Ubc7 und Ubc2, ausreichend polyubiquitiniert, um degradiert zu werden. Diese Beobachtungen legen erneut nahe, dass die untersuchten E2-Proteine nicht am Ubr1-abhängigen ERAD-Weg als Ubiquitin-konjugierende Enzyme beteiligt sind.

6 Diskussion

Die Überwachung der Faltung neusynthetisierter sekretorischer und membrangebundener Proteine in ihre native Konformation ist ein essentieller zellulärer Prozess, der als Protein-Qualitätskontrolle (PQC, engl. *protein quality control*) bezeichnet wird. Dieses Qualitätskontrollsystem vermittelt die Erkennung mutierter, fehlgefalteter Proteine und deren Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Wickner *et al.*, 1999; Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als fehlgefaltet erkannt werden, werden ins Zytosol retrotransloziert, ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (Hiller *et al.*, 1996; Brodsky und McCracken, 1999; Kostova und Wolf, 2003; Ellgaard und Helenius, 2003; Meusser *et al.*, 2005). Die Studien der letzten Jahrzehnte, die in verschiedenen eukaryotischen Organismen mit einem breitem Spektrum an strukturell unterschiedlichen Substraten durchgeführt wurden, enthüllten, wie die ER-assoziierte Degradation (ERAD) generell funktioniert. Das derzeit gängige ERAD-Modell besteht aus zwei kürzlich entdeckten Wegen, die durch die Involvierung zweier verschiedener E3-Ligasen gekennzeichnet sind. Welchem Weg das fehlgefaltete Protein zugeführt wird, hängt von der Lokalisation der Läsion im Substrat ab. Membranproteine mit zytosolisch fehlgefalteten Domänen werden über den ERAD-C-Weg (engl. *cytosolic*, E3 Ubiquitin Ligase Doa10) abgebaut, während lösliche und membrangebundene Substrate mit lumenal lokalisierten Defekten dem ERAD-L-Weg (engl. *luminal*, E3 Ubiquitin Ligase Der3/Hrd1) folgen (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Ismail und Ng, 2006; Vashist und Ng, 2004). Für ERAD-L-Substrate konnten jeweils andere Komponenten, die am Abbau von lumenal fehlgefalteten Membranproteinen mit unterschiedlichen zytosolischen Domänen beteiligt sind, gefunden werden (Taxis *et al.*, 2003; Vashist und Ng, 2004; Kohlmann *et al.*, 2008). Eine Auswahl von modular gleich aufgebauten ERAD-L-Substraten mit definierter Topologie wurde hergestellt, die alle das gleiche Degradationsmotiv im Lumen des ER aufweisen, aber verschiedene zytosolische Domänen besitzen. Allen Modellsubstraten ist die mutierte Carboxypeptidase Y (CPY*) als Abbausignal gemein, die über die letzte Transmembrandomäne des ABC-Transporterproteins Pdr5 an verschiedene zytosolische Domänen fusioniert wurde. CTG* repräsentiert Membranproteine mit einer stabil gefalteten zytosolischen Domäne (Taxis *et al.*, 2003). CTL*myc vertritt membrangebundene Proteine mit zytosolisch "schwächer" gefalteten Domänen (Kohlmann *et al.*, 2008). Als weiteres Substrat wurde in dieser Arbeit CTD* hinzugezogen, das bei Zugabe des Inhibitors Methotrexat (MTX) seine zytosolische DHFR-Domäne von einer relativ schwach gefalteten Struktur in einen starr gefalteten Komplex verändert (Eilers und Schatz, 1986). Der Vorteil dieses Kontrollsubstrats ist das Vorhandensein von unterschiedlich stark gefalteten Domänen in

einem einzigen Molekül. Die Veränderung des C-Terminus von CPY* durch die Fusion einer Transmembrandomäne und einer zytosolischen Domäne führt nicht zu einem weiteren Abbausignal. Die gefalteten Modellsubstrate CPY und CTG werden zu reifen Proteinen prozessiert (Abbildung 5.2). Mit diesem Experiment konnte auch die Befürchtung widerlegt werden (Vashist und Ng, 2004), dass die sehr häufig in den Transmembransegmenten vorkommenden hydrophilen Aminosäuren nicht zwingend zu Abbausignalen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Transmembrandomänen, die isoliert von ihrer nativen Umgebung vorliegen, als Degradationssignale erkannt werden können (Bonifacino *et al.*, 1991; Letourneur und Cosson, 1998; Sato *et al.*, 2003). Um Zellstress durch Überexpression der Substrate (Haynes *et al.*, 2002; Spear und Ng, 2003) zu verhindern, wurde der schwache native *PRC1*-Promotor oder der vergleichbare nicht-induzierte *GAL4*-Promotor für die Untersuchungen verwendet.

Taxis *et al.* (2003) zeigten, dass CTG* abhängig von dem zytosolischen Hsp70-Chaperon Ssa1 abgebaut wird (Abbildung 5.9 A). Die Autoren mutmaßten, dass die Beteiligung von Ssa1 nur aufgrund der stark gefalteten zytosolischen Domäne von CTG* stattfindet. Diese These konnte durch Untersuchungen mit den beiden Substraten Vph1 und CFTR, die prominente zytosolische Domänen besitzen und auch Ssa1-abhängig degradiert werden (Hill und Cooper, 2000; Zhang *et al.*, 2001), untermauert werden. Nun stellte sich die zentrale Frage, ob für die Entfaltung von Substraten mit unterschiedlich stark gefalteter zytosolischer Domäne ein anderes Sortiment an ERAD-Komponenten für den Abbau innerhalb des ERAD-L-Weges gebraucht wird. Infolge von nicht konformen Ergebnissen zweier früherer Veröffentlichungen (Taxis *et al.*, 2003; Vashist und Ng, 2004), wurde die Beteiligung des lumenalen Hsp70-Chaperons Kar2 und dem vierfach die Membran durchspannenden Protein Der1 am Abbau von Membranproteinen erneut untersucht, um einen besseren Einblick in einen möglichen unterschiedlichen Mechanismus am Abbau von zytosolisch unterschiedlich stark gefalteten Substraten zu erhalten. Die Beteiligung von Kar2 im Abbau von Membranproteinen schien keine allgemeine Voraussetzung zu sein (Knop *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997; Taxis *et al.*, 2003). In Import-kompetenten temperatursensitiven *kar2*-Mutanten konnte in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Stabilisierung des CTL*myc Membranproteins unter restriktiven Bedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 5.5 B). CTG* zeigte dagegen eine relativ geringfügige Stabilisierung in temperatursensitiven *kar2*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 5.5 A). Wenn dieser Unterschied in der unterschiedlich stark gefalteten zytosolischen Domäne der ERAD-L-Substrate begründet liegt, sollte das Substrat CTD* darüber Aufschluss geben. Wie erwartet stabilisierte das schwach gefaltete CTD* ohne MTX in temperatursensitiven *kar2*-Mutanten (Abbildung 5.5 C). Kar2 ist hinsichtlich des Abbaus von CTD* mit MTX erforderlich, aber deutlich geringer als im Vergleich zu CTD*

ohne MTX (Abbildung 5.5 D). Die unterschiedlich stark gefalteten zytosolischen Domänen der ERAD-L-Substrate scheinen somit tatsächlich Auswirkung auf die Notwendigkeit von Kar2 für den Abbau zu haben. Grundsätzlich ist Kar2 offenbar am Abbau nicht nur löslicher Substrate, sondern auch an der Degradation membrangebundener Proteine beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Kar2, zusammen mit Jem1 und Scj1, für die Erkennung des ungefalteten lumenalen CPY* Proteins verantwortlich ist (Nishikawa *et al.*, 2001). Möglicherweise erkennt Kar2 generell den lumenalen CPY*-Anteil der Membranproteine und fungiert als Chaperon, das die Substrate in einem löslichen Zustand nahe dem Retrotranslokation hält. Es bleibt allerdings noch unklar, welchen Einfluss die zytosolische Domäne der Substrate hat.

Die beschriebenen ERAD-L-Substrate verhalten sich in *der1*-Deletionsmutanten wie in *kar2*-Mutanten: Die zytosolisch unterschiedlich gefalteten Membranproteine CTL*myc und CTD* ohne MTX werden vollständig in *der1Δ*-Mutanten stabilisiert (Abbildung 5.7 C und D), während die Substrate mit einer auf der zytosolischen Seite stabil gefalteten Domäne, CTG* und CTD* +MTX, verlangsamt abgebaut werden (Abbildung 5.7 B und D). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass auch Der1 nicht nur in den Abbau von löslichen Proteinen involviert ist, sondern zusätzlich auch für die Degradation von bestimmten Membranproteinen erforderlich ist. Wie bereits von Vashist und Ng (2004) vorgeschlagen, ist es möglich, dass Der1 an der Erkennung des lumenalen Degradationsmotivs beteiligt ist. Mit diesen Ergebnissen kann außerdem nachgewiesen werden, dass die isolierte hydrophile Transmembrandomäne des ABC-Transporters Pdr5 in den ERAD-Substraten kein Degradationsmotiv darstellt, da sonst die Substrate unabhängig von Kar2 und Der1 abgebaut werden müssten.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass Kar2 und Der1 über den lumenalen fehlgefalteten Anteil der Substrate wachen, und die Substrate in einem für die Zelle löslichen, transportfähigen Zustand nahe des Retrotranslokons halten. Das zytosolisch stabil gefaltete ERAD-L-Substrat CTG* benötigt die ERAD-Komponenten Kar2 und Der1 daher vermutlich zur Erkennung der Fehlfaltung des CPY*-Anteils. Im Anschluß werden die zytosolischen Ssa-Chaperone der Hsp70-Familie gebraucht, um die stabile zytosolische Domäne von CTG* vor dem Abbau zu entfalten, da offenbar solche komplexen Domänen vom Proteasom allein vor der Degradation nicht entfaltet werden können. Die Tatsache, dass zytosolisch "schwach" gefaltete Substrate wie CTL*myc komplett in *kar2*- und *der1*- Mutanten stabilisiert werden (Abbildung 5.5 B und 5.7 C), eröffnet die Möglichkeit, dass in einem weiteren Schritt die strukturellen Charakteristika der gefalteten Domänen auf der zytosolischen Seite von Chaperonen überprüft werden, und diese bei Bedarf am Entfaltungsprozess mitwirken. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass Membranproteine ohne zytosolische Domäne wie CT* oder

membrangebundene Proteine mit geringen zytosolischen Bereichen wie Sec61 und zytosolisch "schwach" gefaltete Substrate wie CTL*myc unabhängig von dem zytosolischen Hsp70-Chaperon Ssa1 abgebaut werden (Taxis *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001; Abbildung 5.9 B). Bemerkenswerterweise ist Ssa1 für den Abbau von CTD* erforderlich, unabhängig von der Zugabe von MTX (Abbildung 5.9 C). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die zytosolische DHFR-Domäne *per se* strukturelle Eigenschaften aufweist, die Hilfe beim Entfalten benötigt.

Hsp40-Co-Chaperone der DnaJ Familie arbeiten mit Hsp70-Chaperonen im Komplex zusammen und vermitteln deren Substratspezifität (Misselwitz *et al.*, 1998; Johnson und Craig, 2001; Rudiger *et al.*, 2001). Hsp70-Hsp40-Chaperon-Komplexe sind eher dafür bekannt, Proteinaggregationen zu verhindern, anstatt Proteine zu entfalten (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Daher war es nicht verwunderlich, dass das Hsp40-Co-Chaperon Ydj1 nicht direkt in den Abbau von CTD* involviert ist (Abbildung 5.10). Die schnellere Abbaukinetik von CTD* in *ydj1*-Mutanten gegenüber Wildtypzellen, unabhängig von der Zugabe von MTX, könnte jedoch auf eine indirekte Beteiligung im Abbau hinweisen. Bei fehlender Chaperonfunktion kann das Substrat nicht mehr rückgefaltet werden, was potenziell zu Proteinaggregaten führen kann. Daher werden die fehlgefalteten Proteine sofort abgebaut, um Aggregationen zu verhindern.

Besonderes Interesse fiel auf Chaperone mit Entfaltungsaktivität, wie es zum Beispiel von Hsp100-Chaperonen bekannt ist (Glover und Lindquist, 1998; Weber-Ban *et al.*, 1999). Wie aus Abbildung 5.11 ersichtlich wird, werden alle ERAD-L-Substrate mit zytosolisch stark gefalteten Domänen (CTG* und CTD* +MTX) Hsp104-abhängig abgebaut. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit, die darin besteht, dass die Hsp70-Chaperone nicht für die Entfaltung zuständig sind, sondern die stabil gefalteten Domänen nur entfaltet halten. Hsp100-Chaperone mit Entfaltungsaktivität greifen dann aktiv in die Entfaltung der zytosolischen Domänen ein. Für dieses Modell gibt es Hinweise, die mit der Rolle der Hsp70-Chaperone bei der Proteinfaltung übereinstimmen. Dort verhindern sie Aggregationsbildungen durch Bindung an hydrophobe Bereiche in ungefalteten Proteinen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

Der Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex fördert die effiziente Ablösung von ubiquitinierten Proteinen aus der ER-Membran und erleichtert die Retrotranslokation der Substrate ins Zytosol (Ye *et al.*, 2001; Rabinovich *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Nakatsukasa *et al.*, 2008). Neben der erwähnten Aufgabe wird Cdc48 eine Funktion bei der Entfaltung von Proteinen zugeschrieben (DeLaBarre *et al.*, 2006; Beskow *et al.*, 2009; Stolz *et al.*, 2011). Besonders für den zytosolisch sehr stabil gefalteten CTD* +MTX-Komplex ist Cdc48 für den Abbau erforderlich (Abbildung 5.12). Die unterschiedlich starke Stabilisierung von CTD* ohne MTX und CTD* +MTX in einer *cdc48^{ts}*-Mutante könnte auf

eine fehlende Entfaltungsaktivität (engl. *unfoldase*) von Cdc48 zurückzuführen sein. Da möglicherweise nicht viel Energie benötigt wird, um CTD* ohne MTX vor dem proteasomalen Abbau zu entfalten, oder Entfaltungshelfer am Proteasom für dieses Substrat ausreichen, wird es schneller abgebaut. Diese Annahme wurde durch Membranextraktionsexperimente in einer *cdc48^{ts}* Mutante belegt, die zeigen, dass CTD* +MTX über 2 h in die ER-Membran eingebettet liegen bleibt (Abbildung 5.13). Im Wildtyp kann der stabile CTD* +MTX-Komplex jedoch abgebaut werden. Dies deutet darauf hin, dass stabile zytosolische Domänen partiell entfaltet werden müssen, bevor das gesamte Substrat aus der ER-Membran extrahiert werden kann. Dagegen zeigt sich für das zytosolisch schwächere CTD* ohne MTX nur eine leichte Stabilisierung in einer *cdc48^{ts}*-Mutante, die mit den Pulse-Chase Experimenten übereinstimmt (Abbildung 5.12; 5.13, Spur 3 und 4 verglichen mit 7 und 8). Die Notwendigkeit der Entfaltungsaktivität von Cdc48, bei Substraten mit komplexen Domänen lose gefaltete Strukturen herzustellen, um den Abbau durch das Proteasom zu erlauben, konnte durch andere Studien bereits nachgewiesen werden (Golbrik *et al.*, 1999; Beskow *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob der Cdc48 *substrate-processing cofactor* (engl.; Substrat prozessierender Cofaktor) Ufd2, ein E4-Enzym, das vorhandene Ubiquitinketten verlängert (Koepl *et al.*, 1999), am Abbau von membrangebundenen ERAD-L-Substraten beteiligt ist. Keines der drei getesteten Substrate wurde in einer *ufd2*-Deletionsmutante stabilisiert (Abbildung 5.14). Jedoch konnte bei allen drei Substraten mit gegen CPY gerichteten Antikörpern ein Zwischenprodukt im Western Blot detektiert werden (Abbildung 5.14), das nach 30 min vollständig abgebaut ist. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Ufd2 zu Beginn des Abbaus der Membransubstrate als eine Art Initiator benötigt wird, da es für lösliche ERAD-L-Substrate wie CPY*3HA nicht erforderlich ist (Dissertation B. Medicherla, 2004). Das Fehlen des E4-Enzyms führt anfänglich zur Bildung des Zwischenproduktes, welches aber über die Zeit abgebaut wird, und hat keine weiteren Auswirkungen auf die Zelle. Vermutlich kann Ufd2 durch *substrate-processing factors* (engl.; Substrat prozessierende Faktoren) des 19S-Partikels des Proteasoms ersetzt werden, weshalb die membrangebundenen ERAD-L-Substrate auch in einer *ufd2*-Deletionsmutante vollständig abgebaut werden. Bemerkenswerterweise erfolgt bei allen drei Membranproteinen der Abbau in einer *ufd2*-Deletionsmutante schneller als im Wildtyp (Abbildung 5.14). Dies könnte eine Chaperonverwandte Funktion von Ufd2 nahe legen, die Proteinaggregationen zu vermeiden versucht und daher veranlasst, die Substrate schnellstmöglich abzubauen.

Die Identifizierung von Hul5 als proteasomale Komponente, die über die Untereinheit Rpn2 mit dem Proteasom interagiert, gelang der Arbeitsgruppe um Finley (Leggett *et al.*, 2002). Hul5 wurde als E4-HECT-Domänen-Ligase entdeckt, die bereits

vorhandene Ubiquitinketten verlängert (Crosas *et al.*, 2006). Frühere Studien zeigten eine schrittweise Degradation des ERAD-L-Substrats CTL*myc und wiesen nach, dass der vollständige Abbau von CTL*myc von der Hul5-Ligaseaktivität abhängig ist (Kohlmann *et al.*, 2008). Obwohl das zytosolisch stabil gefaltete ERAD-L-Substrat CTG* unabhängig von Hul5 abgebaut wird (Kohlmann *et al.*, 2008), konnte für das ebenfalls zytosolisch stark gefaltete CTD*myc +MTX eine Akkumulation von truncCTD*myc +MTX in einer *hul5*-Deletionsmutante gezeigt werden (Abbildung 5.16 B). CTD*myc ohne MTX wird Hul5-unabhängig wie im Wildtyp abgebaut (Abbildung 5.16 A). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Akkumulation von truncCTD*myc +MTX durch die stark gefaltete Domäne von CTD*myc +MTX bedingt ist. Der CTD*myc +MTX Komplex kann nicht allein durch die AAA-ATPase Cdc48 und dem 26S Proteasom entfaltet und extrahiert werden und wird deshalb von Hul5 weiter modifiziert. Für den Abbau des N-terminalen Bereiches (CPY*) von CTD*myc +MTX ist keine Aktivität der Hul5-Ligase notwendig. Warum das Fragment truncCTD*myc +MTX in einer *hul5*-Deletionsmutante angereichert wird, konnte durch weitere biochemische Versuche mittels des punktmutierten *hul5*^{C878A} *S. cerevisiae* Stammes beantwortet werden. Die katalytische Ligaseaktivität von Hul5 wurde durch den Aminosäureaustausch an der Position 878 von Cystein zu Alanin eliminiert. Dadurch ist das punktmutierte Hul5-Enzym nicht mehr fähig, Multiubiquitinketten zu verlängern (Crosas *et al.*, 2006). Die Ursache für die Anreicherung des C-Terminus von CTD*myc +MTX ist in der fehlenden Verlängerung der Ubiquitinketten zu finden, wie die Cycloheximid-Chase Ergebnisse zeigen (Abbildung 5.17 B).

Die Existenz einer Grundmaschinerie zum Abbau fehlgefalteter Modellsubstrate mit verschiedenen zytosolischen Domänen konnte bereits gezeigt werden (Taxis *et al.*, 2003; Kohlmann *et al.*, 2008). Die vorgestellten Untersuchungen dieser Arbeit offenbaren, dass eine Veränderung der ERAD-L-Substrate auf zytosolischer Seite zu einer Abänderung der Abbaumaschinerie führt. Dabei scheint es so, dass weniger zwischen schwach und stabil gefalteten zytosolischen Domänen unterschieden wird, sondern die strukturellen Eigenschaften der zytosolischen Domänen im Mittelpunkt stehen. Folglich ist entscheidend, ob für die Entfaltung der Domänen ein Startpunkt in der Struktur der zytosolischen Domäne gefunden werden kann, an dem Chaperone und andere Komponenten angreifen können. Die nötige Kraft [pN] zum Entfalten der Domänen folgt der Reihenfolge: DHFR [27] < DHFR +MTX [80] < GFP [104] (Dietz und Rief, 2004; Ainarapu *et al.*, 2005; Abu-Lail *et al.*, 2006). Obwohl die aufgebrauchten Kräfte zum Entfalten von GFP und DHFR +MTX eng beieinander liegen, sind für ihren Abbau andere Komponenten der Abbaumaschinerie erforderlich. Trotz der ähnlich stabilen zytosolischen Domänen unterscheiden sich die Modellsubstrate offensichtlich in ihren strukturellen Eigenschaften, so dass ein Vergleich der Substrate erschwert wird. Daraus lässt sich

schließen, dass jedes der untersuchten Modellsubstrate seine eigene Variation an Komponenten der Abbaumaschinerie benötigt.

CTG* wird prozessiv degradiert und ist abhängig vom zytosolischen Hsp70-Chaperon Ssa1 (Abbildung 5.9 A; Taxis *et al.*, 2003), jedoch unabhängig von der E4-Ligase Hul5 (Kohlmann *et al.*, 2008), woraus zu schließen ist, dass zum Abbau von CTG* keine Ubiquitin-Kettenverlängerung durch Hul5 notwendig ist. Der Abbau der GFP-Domäne erfolgt Ssa1-abhängig nicht nur in einem ERAD-Kontext. Dies konnte durch den proteasomalen Ssa1-abhängigen Abbau des löslichen und instabilen Deg1-GFP-Fusionsproteins (Lenk und Sommer, 2000) gezeigt werden (Taxis *et al.*, 2003). Die starke Beteiligung der zytosolischen Hsp70-Chaperone deuten daraufhin, dass im Falle von CTG* die mutierte lumenale Carboxypeptidase Y nicht der erste Angriffspunkt im Abbau ist. Dabei bleibt weiterhin unklar wie am Beispiel von CTG* die Signalfunktion der CPY*-Domäne von innen nach außen vermittelt wird.

CTL*myc wird lumenal erkannt (Abbildungen 5.5 B und 5.7 C) und sequenziell durch die ERAD-Maschinerie abgebaut. Im Vergleich zu CTG* zeigt CTL*myc einen komplett anderen Abbaumechanismus. Nach Herausschleifen der N-Terminalen CPY*-Domäne von CTL*myc aus dem ER-Lumen ins Zytosol wird ein Großteil dieser Domäne degradiert. Für den Abbau des restlichen C-Terminalen Endes von CTL*myc ist die Polyubiquitinierung durch das E4-Enzym Hul5 essentiell (Kohlmann *et al.*, 2008).

Das Substrat CTD* +MTX zeigt einen ähnlichen Abbaumechanismus wie CTL*myc (Abbildung 5.16 B). Die Tatsache, dass CTD* +MTX in der Stärke der Faltung seiner zytosolischen Domäne aber eher CTG* ähnelt, gibt Hinweise, dass nicht die Stärke, sondern die Struktur der Domänen eine Rolle bei der Wahl des Abbaumechanismus spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den früher bereits beschriebenen Kontrollpunkten, die die fehlgefaltete Beschaffenheit der Proteine überprüft (Vashist und Ng, 2004), mindestens ein weiterer Kontrollpunkt im ERAD-Weg existiert, der die strukturelle Besonderheiten der zytosolisch gefalteten Domänen berücksichtigt und je nach Anforderung andere Komponenten der ERAD-Maschinerie heranzieht.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die zwei großen ERAD-Wege durch die Beteiligung zweier verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen: Der3/Hrd1 und Doa10 (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Ismail und Ng, 2006; Vashist und Ng, 2004). ERAD-L-Substrate wie CPY*, CTG* und CTL*myc werden in Abhängigkeit vom Der3/Hrd1-Hrd3-Komplexes abgebaut (Bordallo *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1999; Taxis *et al.*, 2003; Kohlmann *et al.*, 2008). Sie zeigen jedoch keine vollständige Stabilisierung in einer *der3/hrd1*-Deletionsmutante (Abbildung 5.8;

Taxis *et al.*, 2003), was für eine Beteiligung einer zusätzlichen E3-Ligase spricht. Daher wurde zunächst der Abbau von CTG* in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppelmutante und *hrd3Δ* Mutante untersucht. Auch in diesen Mutanten konnte keine vollständige Stabilisierung für CTG* beobachtet werden (Abbildung 5.8 A). Diese Beobachtung legt einen anderen Abbauweg nahe, der die endgültige Degradation der ERAD-L-Substrate unterstützt.

Eisele und Wolf (2008) veröffentlichten, dass das zytosolisch exprimierte Δ ssCL*myc Substrat Ubr1-abhängig abgebaut wurde. Ubr1 ist als *N-recognin* (engl.; E3-Enzym) aus dem *N-end rule* Weg bekannt (Bartel *et al.*, 1990; Varshavsky, 1996a). Es stellte sich nun die Frage, ob dieses zytosolisch lokalisierte E3-Enzym möglicherweise die Funktion einer E3-Ubiquitin-Ligase im ERAD-Weg übernehmen könnte, wenn beide ER-lokalisierten E3-Ligasen fehlen.

Tatsächlich war der Abbau der beiden ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc vollständig blockiert, wenn Ubr1 zusätzlich zu Der3/Hrd1 und Doa10 in *S. cerevisiae* Zellen deletiert wurde (Abbildung 5.18). Obwohl die Fusionsproteine CTG* und CTL*myc nach dem Abspalten der ER-Signalsequenz einen primären destabilisierenden N-terminalen Rest (Isoleucin; Varshavsky, 1997) tragen, ist der *N-end rule*-Weg nicht am Abbau von CTG* und CTL*myc beteiligt. In einer *ubr1Δ* Mutante werden die ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc wie im Wildtyp abgebaut (Abbildung 5.18). Dies spricht für einen neuen Ubr1-abhängigen Degradationsweg, dem bei Fehlen der zwei kanonischen ER-Ligasen Der3/Hrd1 und Doa10 die Substrate zugeführt werden, und der somit einen sogenannten "back up"-Weg darstellt.

Das lösliche, lumenale CPY*3HA ERAD-L-Substrat sowie das Membranprotein CT* werden nicht über den neuen Ubr1-abhängigen Weg abgebaut (Abbildung 5.19). Allerdings konnte gezeigt werden, dass das ERAD-C-Substrat Ste6* in einer *der3/hrd1 doa10 ubr1*-Tripelmutante stabilisiert wird (persönliche Mitteilung von A. Stolz). Offenbar spielt der neue Ubr1-abhängige "back up"-Weg eine zentrale Rolle im Abbau von Substraten mit außergewöhnlichen zytosolischen Charakteristika.

Die Hauptaufgabe der E3-Ligasen ist die Polyubiquitinierung der Substrate im Zytosol, um sie dem Proteasom zuzuführen. CTG* wird weiterhin sowohl in einer Doppelmutante (*der3/hrd1Δdoa10Δ*) als auch in einer Tripelmutante (*der3/hrd1Δdoa10Δubr1Δ*) polyubiquitiniert (Abbildung 5.22). Die Isolierung von CTG* aus ER-Vesikeln, die mit Proteinase K behandelt wurden, zeigt, dass ein Großteil der Ubiquitinierung verloren geht und ein verkürzter N-terminaler Rest von CTG* (entspricht CT*) geschützt in der ER-Membran verbleibt (Abbildung 5.23 A). Die zusätzliche Behandlung der ER-Vesikel mit dem Detergenz Triton® X-100 führt zu einem vollständigen Verdau von CTG*. Daraus kann geschlossen werden, dass CTG* hauptsächlich auf der zytosolischen Seite polyubiquitiniert wird. Für CTL*myc konnte ein vollständiger Verdau der

Polyubiquitinierung bei Behandlung mit Proteinase K beobachtet werden (Abbildung 5.23 C). Kohlmann *et al.* (2008) zeigten, dass bei inhibiertem Proteasom CTL*myc vollständig stabilisiert in der ER-Membran vorliegt und somit das Proteasom maßgeblich an der Extraktion von CTL*myc involviert ist. Bei inhibiertem Proteasom geht der Kontakt zwischen CTL*myc und dem Proteasom verloren. Da die E3-Ubiquitin-Ligase Der3/Hrd1 aktiv weiterarbeitet, wird CTL*myc vermutlich weiterhin polyubiquitiniert. Polyubiquitinierung kann ein Zurückrutschen des Substrats ins ER verhindern (Jarosch *et al.*, 2002). Es kann angenommen werden, dass der N-terminale Anteil von CTL*myc polyubiquitiniert im Zytosol stecken bleibt. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen in Abbildung 5.21 B unterstützt. Im Überstand konnten dort bei inhibiertem Proteasom noch geringe Mengen an schon möglicherweise polyubiquitiniertem CTL*myc detektiert werden. Dieser Anteil geht komplett verloren, wenn zusätzlich beide Gene, die für die ER-lokalisierten E3-Ubiquitin-Ligasen exprimieren, deletiert werden. Bei Behandlung mit Proteinase K ist nun eine Unterscheidung nicht mehr möglich, da der N-Terminus von CTL*myc nicht geschützt in der ER-Membran vorliegt. Es kann daher keine Aussage über die exakte Lokalisierung der Polyubiquitinierung im Fall von CTL*myc getroffen werden. Es ist bekannt, dass die RING-H2-Domäne von Ubr1 für die Ubiquitinierung von *N-end rule*-Substraten erforderlich ist (Xie *et al.*, 1999). Weitere Erkenntnisse, inwiefern die katalytische Ligase Aktivität von Ubr1 in den Abbau der Substrate involviert ist, könnten durch biochemische Analysen mit Hilfe einer RING-H2-Domänen-Mutante von Ubr1 erhalten werden.

In vorangegangenen Studien konnte durch den glykosylierten CPY*-Anteil von CTG* gezeigt werden, dass dieses membrangebundene ERAD-L-Substrat in das ER importiert wird (Taxis *et al.*, 2003). Um sicher zu stellen, dass durch das Fehlen der beiden E3-ER-Ligasen der Import der Substrate in das ER nicht gestört ist, wurde die Glykosylierung und der Einbau der ERAD-L-Substrate CTG* und CTL*myc in die ER-Membran überprüft. Durch Inkubation mit dem Zuckerketten abspaltenden Enzym *Endoglykosidase H* wird das Molekulargewicht von CTG* erniedrigt (Taxis *et al.*, 2003; persönliche Mitteilung von A. Stolz). Aus Abbildung 5.21 wird ersichtlich, dass die Substrate bei inhibiertem Proteasom weiterhin in der ER-Membran verankert sind. Diese Versuche zeigen, dass die Substrate in die ER-Membran eingebaut und der lumenale CPY*-Anteil auch weiterhin im neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg glykosyliert wird.

Der beobachtete additive Effekt auf den Abbau bei Fehlen von Ubr1 bei gleichzeitiger Deletion der beiden kanonischen ER-Ligasen (Kapitel 5.3.1; Abbildung 5.18 A) war für CTG* am markantesten. Daher wurde hauptsächlich mit diesem Substrat weiter gearbeitet. Die Degradation von CTG* ist im neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg vom

Proteasom abhängig (Abbildung 5.24). Zur Kontrolle wurde der in DMSO gelöste Proteasominhibitor MG132 durch das Lösungsmittel DMSO allein ersetzt. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Abbau von CTG* in einer *pdr5 der3/hrd1 doa10*-Deletionsmutante dem in einer *der3/hrd1 doa10*-Doppeldeletionsmutante gleicht.

Durch Degradationsstudien in verschiedenen Deletionsstämmen wurden weitere Komponenten, die nun im neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg beteiligt sind, identifiziert. Zunächst wurde die Beteiligung der aus dem ERAD-Weg bekannten Bestandteile der Abbaumaschinerie getestet.

Der1 zeigte eine schwache Beteiligung am Abbau von CTG* (Abbildung 5.7 B). Daher wurde überprüft, ob Der1 auch im neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg involviert ist. Dies scheint nicht der Fall zu sein, da in einer *der3/hrd1 doa10 der1*-Tripeldeletionsmutante kein zusätzlicher Effekt im Abbau von CTG* zu beobachten war (Abbildung 5.25 A). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Der1-Homolog Dfm1 (Hitt und Wolf, 2004a) marginal für den Abbau von CTG*, darüber hinaus aber in starkem Maße für den Abbau des ERAD-C-Substrats Ste6* in ERAD benötigt wird (Stolz *et al.*, 2010). Der Fakt, dass Ste6* auch über den neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg abgebaut wird (persönliche Mitteilung von A. Stolz), eröffnete die Möglichkeit, die Beteiligung von Dfm1 in diesem neuen Weg zu untersuchen. Die Pulse-Chase Analysen zeigten jedoch keinen Einfluss von Dfm1 auf den Abbau von CTG* im Ubr1-abhängigen "back up"-Weg (Abbildung 5.25). Somit konnte für die Membranproteine Der1 (Lilley *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2004) und Dfm1 eine Funktion als Retrotranslokationskanal im Rahmen des neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weges ausgeschlossen werden. Obwohl die beiden kanonischen ERAD-Ligasen transmembrandurchspannende Domänen besitzen, die in der Lage wären einen Retrotranslokationskanal zu bilden (Mehnert *et al.*, 2010), können die E3-Ligasen Der3/Hrd1 und Doa10 im Falle der in dieser Arbeit getesteten Substrate ebenso im Rahmen des Ubr1-abhängigen "back up"-Weges exkludiert werden. Da Ubr1 nur aktiv im "back up"-Weg arbeitet, wenn die beiden kanonischen ER-E3-Ligasen fehlen, können Der3/Hrd1 und Doa10 bei den getesteten Substraten keine Kanalfunktion ausüben. Indirekte Beweise deuten darauf hin, dass der Importkanal Sec61 im ERAD-Weg auch als Exportkanal fungiert (Wiertz *et al.*, 1996; Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2008; Schäfer und Wolf, 2009). In dieser Arbeit durchgeführte Cycloheximid-Chase Experimente zeigen, dass CTG* unter restriktiven Bedingungen in einer *sec61-2 der3/hrd1Δdoa10Δ* Mutante stabilisiert (Abbildung 5.26 B). Da nur qualitative Ergebnisse zu diesem Experiment vorliegen, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, ob Sec61 Teil des neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weges ist. Weitere biochemische Analysen werden Aufschluss über die genaue Funktion von Sec61 in den ERAD-Wegen geben.

Eine wichtige Komponente im Abbau bzw. der Extraktion der ERAD-L-Substrate aus dem ER ist der Cdc48-Npl4-Ufd1-Komplex (Johnson *et al.*, 1995; Ghislain *et al.*, 1996; Koegl *et al.*, 1999; Hoppe *et al.*, 2000; Bays *et al.*, 2001b; Hitchcock *et al.*, 2001; Rape *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002). Obwohl angenommen wird, dass dieser Komplex allgemein am Abbau von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER beteiligt ist, konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Pulse-Chase Analysen überraschenderweise keine Beteiligung am neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg zum Abbau von CTG* nachgewiesen werden (Abbildung 5.27). Ubx2, das Cdc48 an die ER Membran rekrutiert (Schuberth und Buchberger, 2005; Neuber *et al.*, 2005) ist eventuell ebenso wenig an diesem Weg beteiligt (Abbildung 5.28). Dies deutet darauf hin, dass andere Komponenten die Funktion der Extraktion von CTG* aus der ER-Membran im Rahmen dieses "back up"-Weges übernehmen müssen. Solche Proteine agieren als Motormodule. Es ist bekannt, dass der Cdc48-Npl4-Ufd1-Komplex mit dem Proteasom assoziiert ist, genauso wie die Hsp70-Chaperone der Ssa-Familie (Verma *et al.*, 2000). Da für den Abbau von CTG* die Beteiligung von Ssa1 erforderlich ist (Abbildung 5.9 A; Taxis *et al.*, 2003), könnte dieses im Zytosol agierende Hsp70-Chaperon als "Motor" die Extraktion übernehmen und die extrahierten Proteine zum Proteasom eskortieren. Dafür spricht, dass CTG* in einer temperatursensitiven *ssa1-45*-Mutante unter restriktiven Bedingungen polyubiquitiniert in der ER-Membran verankert liegen bleibt (Dissertation S.H. Park, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass keine Rekrutierung von Flag-Ubr1 an die ER-Membran stattfindet (Abbildung 5.20) und daher wird vermutet, dass Ssa1 möglicherweise die Substrate auf ihrem Weg zum Proteasom entfaltet oder durch Bindung an hydrophobe Bereiche entfaltet hält. Hlj1 konnte als Hsp40-Co-Chaperon der Hsp70-Familie identifiziert werden (Beilharz *et al.*, 2003; Huyer *et al.*, 2004; Youker *et al.*, 2004) Die Beteiligung von Hlj1 am Abbau von CTG* im Rahmen des Ubr1-abhängigen "back up"-Weges deutet indirekt auch auf eine Involvierung von Ssa1 hin (Abbildung 5.29). Tatsächlich konnten fortführende Studien zeigen, dass CTG* in einer konditionalen *ssa1-45*-Mutante, der zusätzlich die beiden kanonischen E3-Ligasen fehlen, nicht mehr im Rahmen des Ubr1-abhängigen "back up"-Weges abgebaut wird (persönliche Mitteilung von A. Stolz).

In *S. cerevisiae* gilt Ubc2 als das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) im Ubr1-abhängigen *N-end rule*-Weg, welches aktivierte Ubiquitin-Einheiten auf Substrate überträgt, die gezielt dem Abbau zugeführt werden sollen (Dohmen *et al.*, 1991a). Der Einfluss dieses E2-Enzyms auf das Degradationsverhalten von CTG* im neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg wurde in dieser Arbeit *in vivo* durch biochemische Experimente in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ ubc2Δ*-Mutante getestet. Der Abbau von CTG* verhielt sich in einer *der3/hrd1Δ doa10Δ ubc2Δ*-Mutante wie in einer *der3/hrd1Δ doa10-*

Deletionsmutante (Abbildung 5.30). Da im ERAD-Weg für den Abbau von CTG* die Beteiligung von Ubc6 und Ubc7 beobachtet werden konnte (Taxis *et al.*, 2003), wurde auch der Einfluss dieser beiden E2-Enzyme im alternativen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg geprüft. Jedoch erfolgte der Abbau von CTG* auch im Rahmen dieser Frage durchgeführten Pulse-Chase Analysen in einer *der3/hrd1Δdo10Δubc6Δubc7Δ*-Mutante wie in einer *der3/hrd1 do10*-Deletionsmutante (Abbildung 5.31). Im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-"back up"-Weg agieren somit bei der Degradation von CTG* weder Ubc2, noch die aus dem ERAD-Weg bekannten E2 Enzyme Ubc6 und Ubc7 als Partner von Ubr1. Es gibt verschiedene Gründe, warum diese Analysen die Beteiligung von bekannten E2-Enzymen vermeintlich ausschließt. Eine Erklärung für die fehlgeschlagene Identifikation des beteiligten E2-Enzyms im neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weg könnte mit Hilfe einer Redundanz dieser Proteine erklärt werden. Wenn mehrere E2-Enzyme die Fähigkeit besitzen, fehlgefaltete Proteine zu erkennen und die Ubiquitinierung und somit den Abbau des Modellsubstrats zu vermitteln, würde der Ausfall nur eines der Enzyme nicht zu einem detektierbaren Phänotyp führen. Die Funktion dieses E2-Enzyms könnte dann durch die Aktivität eines anderen Enzyms kompensiert werden. Des Weiteren wurde in der vorgelegten Arbeit erstmals die Ubr1-abhängige Degradation eines membrangebundenen ERAD-L-Substrats untersucht. Zuvor wurde vor allem die Degradation von *N-end rule*-Substraten (Bachmaier *et al.*, 1986) und zytosolisch lokalisierten ERAD-Substraten (Eisele und Wolf, 2008) in *ubr1*-Deletionsmutanten analysiert. Deshalb ist es möglich, dass Ubr1 im neuen ERAD-"back up"-Weg mit anderen E2-Partnerenzymen als bisher beobachtet, agiert. Die Annahme, dass andere, noch unbekannte E2-Enzyme im neuen Ubr1-abhängigen Weg eine Rolle spielen wird auch dadurch unterstützt, dass CTG* weiterhin in *der3/hrd1Δ do10Δ ubc2Δ*- und in *der3/hrd1Δ do10Δ ubc6Δ ubc7Δ*- Mutanten polyubiquitiniert wird (Abbildung 5.32). Durch Degradationsstudien von CTG* in Einzel- und Mehrfach-Deletionsmutanten weiterer Ubiquitin-konjugierender Enzyme könnten die im neuen Ubr1-abhängigen ERAD-"back up"-Weg spezifisch mit Ubr1 wirkenden E2-Partnerenzyme identifiziert werden.

Die Beobachtung, dass eine *der3/hrd1 do10*-Doppeldeletion nicht zu einer vollständigen Stabilisierung von Membranproteinen führt, legte die Existenz einer weiteren E3-Ubiquitin-Ligase nahe. Der in dieser Arbeit entdeckte neue Ubr1-abhängige "back up"-Weg unterstützt die endgültige Eliminierung der fehlgefalteten Substrate. Welche Eigenschaften der Substrate zu einem Abbau durch den Ubr1-abhängigen "back up"-Weg führen, muss noch beantwortet werden. Da dem Ubr1-abhängigen "back up"-Weg nur membrangebundene Substrate mit zytosolischen Domänen (CTG*, Ste6*, CTL*myc) zugeführt werden, stellen diese vermutlich eine Art Signal oder Degradationsmotiv, das

wegweisend ist, dar. Die Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der zytosolischen Domänen könnte einen Hinweis auf auffällige Motive liefern. Um den Abbaumechanismus besser zu verstehen, ist es unvermeidlich die weiteren beteiligten Komponenten und ihre genaue Funktion aufzuklären. Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sind sicher die aus dem ERAD-L-Weg bekannten, ER-luminal lokalisierten Lektine und Chaperone. Vielleicht sind auch bisher unbekannte Faktoren beteiligt, die es zu identifizieren gilt. Beispielsweise könnten Chaperone, wie Rot1, die nicht im ERAD-Weg involviert sind, nun ein Teil des neuen Ubr1-abhängigen "back up"-Weges sein. Von Bedeutung wird auch die Aufklärung über die Art des neuen Weges sein. Dabei stellt sich die zentrale Frage, ob es sich um eine Art "Reservesystem" handelt, welches in Anspruch genommen wird, wenn der ERAD-Weg beispielsweise aufgrund der ausgeprägten zytosolischen Domänen überfordert ist. Es könnte sich aber auch um einen neuen eigenständigen Weg handeln. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Zelle umfangreiche Mittel besitzt, um sich fehlgefalteter sekretorischer Proteine ohne ERAD zu entledigen und so einer Schädigung der Zellfunktion zu entgehen (Wang *et al.*, 2010).

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Lail, N. I., Ohashi, T., Clark, R. L., Erickson, H. P., and Zauscher S. (2006) Understanding the elasticity of fibronectin fibrils: Unfolding strengths of FN-III and GFP domains measured by single molecule force spectroscopy. *Matrix Biol.* **25**, 175–184.
- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., and Molinari, M. (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* **35**, 74-82.
- Ainavarapu, S. R. K., Li, L., Badilla, C. L., and Fernandez, J. M. (2005) Ligand Binding Modulates the Mechanical Stability of Dihydrofolate Reductase. *Biophysical J* **89**, 3337-3344.
- Alder, N. N. and Theg, S. M. (2003) Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem Sci* **28**, 442–451.
- Ausubel, F. M., Kingston, R. E., Seidman, F. G., Struhl, K., Moore, D. D., Brent, R., and Smith, F. A. (1992) Current Protocols in Molecular Biology. *Greene*, New York.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.
- Bachmair, A., and Varshavsky, A. (1989) The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* **56**, 1019-1032.
- Bajorek, M., and Glickman, M.H. (2004) Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1579-1588.
- Bartel, B., Wunning, I. and Varshavsky, A. (1990) The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J.* **9**, 3179-3189.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemüller, E. (1998) The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Bays, N. W., Gardner, R. G., Seelig, L. P., Joazeiro, C. A., and Hampton, R. Y. (2001) Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 24-29.
- Bays, N.W., Wilhovsky, S.K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K. and Hampton R.Y. (2001) *HRD4/NPL4* Is Required for the Proteasomal Processing of Ubiquitinated ER Proteins. *Mol. Biol. Cell* **12**, 4114-4128.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E.A. (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation *in vivo*. *Mol Cell Biol* **16**, 4378-4386.
- Beilharz, T., Egan, B., Silver, P. A., Hofmann, K., and Lithgow, T. (2003) Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **278**, 8219-8223.
- Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M. R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P., and Lacombe, F. (1994) A flow cytometric method using Hoechst 3342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* **17**, 59-65.
- Berghammer, H., and Auer, B. (1993) "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques.* **14**, 524–528.
- Beskow, A., Grimberg, K. B., Bott, L. C., Salomons, F. A., Dantuma, N. P., and Young, P. (2009) A Conserved Unfoldase Activity for the p97 AAA-ATPase in Proteasomal Degradation. *J. Mol. Biol.* **394**, 732–746.
- Beuron, F., Flynn, T. C., Ma, J., Kondo, H., Zhang, X., and Freemont, P. S. (2003) Motions and negative cooperativity between p97 domains revealed by cryo-electron microscopy and quantised elastic deformational model. *J Mol Biol* **327**, 619-629.

- Bhamidipati, A., Denic, V., Quan, E.M., and Weissman, J.S. (2005) Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell* **19**, 741-751.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1996) Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **15**, 2069-2076.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278**, 1806-1809.
- Bonifacino, J. S., Cosson, P., Shah, N., and Klausner, R. D. (1991) Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **10**, 2783-2793.
- Bordallo, J., Plemper, R. K., Finger, A., and Wolf, D. H. (1998) Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* **9**, 209-222.
- Bordallo, J., and Wolf, D. H. (1999) A RING-H2 finger motif is essential for the function of Der3/Hrd1 in endoplasmic reticulum associated protein degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **448**, 244-248.
- Borts, R. H., Lichten, M. and Haber, J. E. (1986) ANALYSIS OF MEIOSIS-DEFECTIVE MUTATIONS IN YEAST BY PHYSICAL MONITORING OF RECOMBINATION. *Genetics* **113**, 551-567.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* **1**, 221-226.
- Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S. and Jentsch, S. (2002) Role of the ubiquitin-selective CDC48^{UFD1/NPL4} chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* **21**, 615-621.
- Brodsky, J.L., Goekeler, J., and Schekman, R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 9643-9646.
- Brodsky, J. L., and McCracken, A. A. (1999) ER protein quality control and Proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 507-513.
- Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goekeler, J. L., Kruse, K. B., and McCracken, A. A. (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* **274**, 3453-3460.
- Burnett, B., Li, F., and Pittman, R. N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* **12**, 3195-205.
- Buschhorn, B., Kostova, Z., Medicherla, B., and Wolf, D.H. (2004) A genome wide screen identifies Yos9p as a new lectin essential for ER-associated degradation (ERAD) of glycoproteins. *FEBS Lett.* **577**, 422-426.
- Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T. A. (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**, 361-373.
- Casagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zuniga, M., Brown, P. O., and Ploegh, H. (2000) Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell* **5**, 729-735.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.
- Chiang, H. L., and Schekman, R. (1991) Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature* **350**, 313-318.
- Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D. M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., and Aebi, M. (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* **184**, 159-172.

- Corsi, A. K., and Schekman, R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**, 30299-30302.
- Costanzo, M. C., Crawford, M. E., Hirschman, J. E., Kranz, J. E., Olsen, P., Robertson, L. S., Skrzypek, M. S., Braun, B. R., Hopkins, K. L., Kondu, P., Lengieza, C., Lew-Smith, J. E., Tillberg, M., and Garrels, J. I. (2001) YPD, PombePD and WormPD: model organism volumes of the BioKnowledge library, an integrated resource for protein information. *Nucleic Acids Res.* **29**, 75-79.
- Cox, B. S., and Parry, J. M. (1968) The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet light sensitive mutants in yeast. *Mutat Res* **6**, 37-55.
- Cox, J. S., and Walter, P. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404.
- Craig, E. A., and Lindquist, S. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* **22**, 631-677.
- Craig, E. A., Gambill, B.D., and Nelson, R. J. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev.* **57**, 402-414.
- Crosas, B., Hanna, J., Kirkpatrick, D. S., Zhang, D. P., Tone, Y., Hathaway, N. A., Buecker, C., Leggett, D. S., Schmidt, M., King, R. W., Gygi, S. P., and Finley, D. (2006) Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin Ligase and deubiquitinating activities. *Cell* **127**, 1401-1413.
- Davies, J. M., Tsuruta, H., May, A. P., and Weis, W. I. (2005) Conformational changes of p97 during nucleotide hydrolysis determined by small-angle X-Ray scattering. *Structure* **13**, 183-195.
- Deak, P. M., and Wolf, D. H. (2001) Membrane topology and function of der3/hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (e3) involved in endoplasmic reticulum degradation, *J Biol Chem* **276**, 10663-10669.
- Decottignies, A., Evain, A., and Ghislain, M. (2004) Binding of Cdc48p to a ubiquitinrelated UBX domain from novel yeast proteins involved in intracellular proteolysis and sporulation. *Yeast* **21**, 127-139.
- DeLaBarre, B., Christianson, J. C., Kopito, R. R., and Brunger, A. T. (2006) Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD. *Mol Cell.* **22**, 451-462.
- Denic, V., Quan, E. M., and Weissman, J. S. (2006) A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* **126**, 349-359.
- Dietz, H., and Rief, M. (2004) Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments. *PNAS* **101**, 16192-16197.
- Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-890.
- Dohmen, R. J., Madura, K., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1991a) The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 7351-7355.
- Du, F., Navarro-Garcia, F., Xia, Z., Tasaki, T., and Varshavsky, A. (2002) Pairs of dipeptides synergistically activate the binding of substrate by ubiquitin ligase through dissociation of its autoinhibitory domain. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 14110-14115.
- Eilers, M., and Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* **322**, 228-232.
- Eisele, F., and Wolf, D. H. (2008) Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1. *FEBS* **582**, 4143-4146.
- Eisele, F., Schäfer, A., and Wolf, D. H. (2010) Ubiquitylation in the ERAD Pathway. *Subcell Biochem.* **54**, 136-148.
- Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191.

- Elsasser, S., and Finley, D. (2005) Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol* **7**, 742–749.
- Enenkel, C., Lehmann, A., and Kloetzel, P.M. (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *Embo J* **17**, 6144-6154.
- Enenkel, C., Lehmann, A., and Kloetzel, P.M. (1999) GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep* **26**, 131-135.
- Fernandez, F.S., Trombetta, S. E., Hellman, U., and Parodi, A. J. (1994) Purification to homogeneity of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 30701–30706.
- Finger, A., Knop, M., and Wolf, D. H. (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.
- Friedberg, E. C. (1988) Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 70-102.
- Friedländer, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 379–384.
- Fröhlich, K. U. (2001) An AAA family tree. *J Cell Sci.* **114**, 1601-1602.
- Game, J. C., Zamb, T. J., Braun, R. J., Resnick, M., and Roth, R. M. (1980) The Role of Radiation (rad) Genes in Meiotic Recombination in Yeast. *Genetics* **94**, 51-68.
- Gardner, R.G., Swarbrick, G.M., Bays, N.W., Cronin, S.R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C., and Hampton, R.Y. (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* **151**, 69-82.
- Gardner, R. G., Nelson, Z. W., and Gottschling, D. E. (2005) Degradation-Mediated Protein Quality Control in the Nucleus. *Cell* **120**, 803–815.
- Gauss, R., Jarosch, E., Sommer, T., and Hirsch, C. (2006a) A complex of Yos9p and the HRD ligase integrates endoplasmic reticulum quality control into the degradation machinery. *Nat Cell Biol* **8**, 849-854.
- Gauss, R., Sommer, T., and Jarosch, E. (2006b) The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *Embo J* **25**, 1827-1835.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-741.
- Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F., and Varshavsky, A. (1996) Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**, 4884-4899.
- Gietz, R. D., and Woods, R. A. (2002) TRANSFORMATION OF YEAST BY THE Liac/SS CARRIER DNA/PEG METHOD. *Methods in Enzymology* **350**, 87-96.
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., de La Cruz, F.J., and Römisch, K. (1999) Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell Biol.* **147**, 1443–1456.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623.

- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Larsen, C.N., Schmidt, M., and Finley, D. (2000) The regulatory particle of the yeast proteasome. In: *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*, eds. W. Hilt and D.H. Wolf: Landes Bioscience, Georgetown/Eurekah.com, Austin, USA, 71-90.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373–428.
- Glover, J. R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins. *Cell* **94**, 73-82.
- Gnann, A., Riordan, J.R., and Wolf, D.H. (2004) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Degradation Depends on the Lectins Htm1p/EDEM and the Cdc48 Protein Complex in Yeast. *Mol Biol Cell* **15**, 4125-4135.
- Goebel, M. G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J. P., Varshavsky, A., and Byers, B. (1988) The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* **241**, 1331–1335.
- Golbik, R., Lupas, A. N., Koretke, K. K., Baumeister, W., and Peters, J. (1999) The Janus face of the archaeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding. *Biol Chem.* **380**, 1049-1062.
- Goldberg, A. L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895-899.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062-1067.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-2524.
- Güldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30**, e23.
- Gusarova, V., Caplan, A. J., Brodsky, J. L., and Fisher, E. A. (2001) Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem.* **276**, 24891-24900.
- Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego.
- Hagner, N., and Joerger, M. (2010) Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer Manag Res.* **2**, 293-301.
- Haigh, N. G., and Johnson, A. E. (2002) Protein sorting at the membrane of the endoplasmic reticulum, In *Protein targeting, transport and translocation*. R. E. Dalbey, and G. von Heijne, eds. (London-New York: Academic Press), 74-106.
- Hanna, J., and Finley, D. (2007) A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* **581**, 2854-2861.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hampton, R. Y., Gardner, R.G., and Rine J. (1996) Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell.* **7**, 2029-2044.
- Hampton, R. Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 476–482.
- Han, S., Liu, Y., and Chang, A. (2007) Cytoplasmic Hsp70 promotes ubiquitination for endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded mutant of the yeast plasma membrane ATPase, PMA1. *J Biol Chem.* **282**, 26140-26149.
- Hartl, F. U., und Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.

- Hartmann-Petersen, R., Wallace, M., Hofmann, K., Koch, G., Johnsen, A. H., Hendil, K. B., and Gordon, C. (2004) The Ubx2 and Ubx3 cofactors direct Cdc48 activity to proteolytic and nonproteolytic ubiquitin-dependent processes. *Curr. Biol.* **14**, 824-828.
- Haynes, C. M., Caldwell, S., and Cooper, A. A. (2002) An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J. Cell Biol.* **158**, 91-101.
- Hebert, D. N., and Molinari, M. (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* **87**, 1377–1408.
- Heck, J. W., Cheung, S. K. and Hampton, R. Y. (2010) Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 1106-1111.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C., and Wolf, D. H. (1991a) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J* **10**, 555-562.
- Heinemeyer, W., Simeon, A., Hirsch, H. H., Schiffer, H. H., Teichert, U., and Wolf, D. H. (1991b) Lysosomal and non-lysosomal proteolysis in the eukaryotic cell: studies on yeast. *Biochem Soc Trans* **19**, 724-725.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D.H. (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**, 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2004) The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1562-1578.
- Helenius, A., Trombetta, E. S., Hebert, D. N., and Simons, J. F. (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* **7**, 193–200.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* **73**, 1019-1049.
- Hendershot, L. M. (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* **71**, 289–297.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Hill, K., and Cooper, A. A. (2000) Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system. *EMBO J.* **19**, 550-561.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D. H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **273**, 1725-1728.
- Hilt, W., and Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* **21**, 96-102.
- Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K., Hosokawa, N. (2006) EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem* **281**, 9650-9658.
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S. C., Neuber, O., and Sommer, T. (2009) The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**, 453-460.
- Hitchcock, A. L., Krebber, H., Fietze, S., Lin, A., Latterich, M., and Silver, P. A. (2001) The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation, *Mol Biol Cell* **12**, 3226-3241.
- Hitt, R., and Wolf, D. H. (2004) Der1p, a protein required for degradation of malfolded soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res.* **4**, 721-729.

- Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**, 645-653.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/Proteasome dependent processing. *Cell* **102**, 577-586.
- Horn, S. C., Hanna, J., Hirsch, C., Volkwein, C., Schütz, A., Heinemann, U., Sommer, T., and Jarosch, E. (2009) Usa1 Functions as a Scaffold of the HRD-Ubiquitin Ligase. *Mol Cell* **36**, 782-793.
- Horton, L. E., James, P., Craig, E. A., and Hensold, J. O. (2001) The yeast hsp70 homologue Ssa is required for translation and interacts with Sis1 and Pab1 on translating ribosomes. *J Biol Chem* **276**, 22.
- Huyer, G., Piluek, W.F., Fansler, Z., Kreft, S.G., Hochstrasser, M., Brodsky, J.L., and Michaelis, S. (2004) Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* **279**, 38369-38378.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ismail, N., and Ng, D. T. (2006) Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble! *Cell* **126**, 237-239.
- Jacobs, D. B., and Phipo, C. (1983) Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure antibody-mediated cytotoxicity. Resolution of complement-sensitive and resistant cells. *J Immunol Meth* **62**, 101-110.
- Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J., and Aeby, M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* **142**, 1223-1233.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., and Sommer, T. (2002) Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* **4**, 134-139.
- Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L., and Riordan, J. R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**, 129-135.
- Jentsch, S., McGrath, J. P., and Varshavsky, A. (1987) The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**, 131-134.
- Jentsch, S., and Rumpf, S. (2007) Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci* **32**, 6-11.
- Jermey, A. J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B. M., and Stirling, C. J. (2006) The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J Biol Chem* **281**, 7899-7906.
- Johnston, J. A., Johnson, E. S., Waller, P. R. H., and Varshavsky, A. (1995) Methotrexate inhibits proteolysis of dihydrofolate reductase by the N-end rule pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 8172-8178.
- Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M., and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**, 17442-17456.
- Johnson, J. L., and Craig, E. A. (2001) An Essential Role for the Substrate-binding Region of Hsp40s in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* **152**, 851-856.
- Juretschke, J., Menssen, R., Sickmann, A., and Wolf, D. H. (2010) The Hsp70 chaperone Ssa1 is essential for catabolite induced degradation of the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* **397**, 447-452.
- Kabani, M., Kelley, S. S., Morrow, M. W., Montgomery, D. L., Sivendran, R., Rose, M. D., Gierasch, L. M., and Brodsky, J. L. (2003) Dependence of Endoplasmic Reticulum-associated Degradation on the Peptide Binding Domain and Concentration of BiP. *Mol Biol. Cell* **14**, 3437-3448.

- Käser, M., and Langer T. (2000) Protein degradation in mitochondria. *Semin Cell Dev Biol.* **11**, 181-190.
- Kelley, W. L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci.* **23**, 222-227.
- Kelley, W. L. (1999) Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr Biol* **9**,R305-308.
- Kim, W., Spear, E.D., and Ng, D.T. (2005) Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* **19**, 753-764.
- Kim, I., Ahn, J., Liu, C., Tanabe, V, Apodaca, J., Suzuki, T., and Rao, H. (2006) The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. *J Cell Biol* **172**, 211–219.
- Kim, I., Li, Y., Muniz, P., and Rao, H. (2009) Usa1 protein facilitates substrate ubiquitylation through two separate domains. *PLoS One.* **4**, e7604.
- Kimata, Y., Kimata, Y.I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I.C., Takeuchi, M., Rose, M.D., and Kohno, K. (2003) Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell.* **14**, 2559-2569.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., and Wolf, D. H. (1996a) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J* **15**, 753-763.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-644.
- Koehler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., and Finley, D. (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* **7**, 1143-1152.
- Kohlmann, S., Schafer, A., and Wolf, D.H. (2008) Ubiquitin ligase Hul5 is required for fragment-specific substrate degradation in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* **283**, 16374-16383.
- Kopito, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**,524-530.
- Kostova, Z., and Wolf, D. H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* **22**, 2309-2317.
- Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2005) Importance of carbohydrate positioning in the recognition of mutated CPY for ER-associated degradation. *J Cell Sci* **118**, 1485-1492.
- Krobitsch, S., and Kazantsev, A. G. (2011) Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *Int J Biochem Cell Biol.* **43**, 20-24.
- Kupiec, M., and Simchen, G. (1984) Cloning and integrative deletion of the *RAD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **8**, 559-866.
- Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L., and Pickart, C. M. (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**, 763-767.
- Lawrence, C. W., Steward, J. W., Sherman, F., and Christensen, R. (1974) Specificity and frequency of ultraviolet-induced reversion of an iso-1-cytochrome *c* ochre mutant in radiation-sensitive strains of yeast. *J Mol Biol* **85**, 137–162.
- Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H., and Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* **10**, 495-507.
- Lehle, L., Strahl, S., and Tanner, W. (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie (International ed)* **45**, 6802-6818.

- Lenk, U., and Sommer, T. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *J Biol Chem.* **275**, 39403-39410.
- Letourneur, F., and Cosson, P. (1998) Targeting to the endoplasmic reticulum in yeast cells by determinants present in transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 33273-33278.
- Levin, S. (1995) Commentary: a toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues. *Toxicol Path* **23**, 533-539.
- Li, H., Oberhauser, A. F., Fowler, S. B., Clarke, J., and Fernandez, J. M. (2000) Atomic force microscopy reveals the mechanical design of a modular protein. *PNAS* **97**, 6527-6531.
- Li, W., Schulman, S., Boyd, D., Erlandson, K., Beckwith, J., and Rapoport, T. A. (2007) The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *Mol Cell.* **26**, 511-521.
- Lilley, B. N., and Ploegh, H. L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834-840.
- Lim, H.-S., Archer, C. T., and Kodadek, T. (2007) Identification of a Peptoid Inhibitor of the Proteasome 19S Regulatory Particle. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 7750-7751.
- Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C. M., and Sifers, R.N. (1997) Intracellular disposal of incompletely folded human alpha1-antitrypsin involves release from calnexin and post-translational trimming of asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **272**, 7946-7951.
- Liu, C.-W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N., and Thomas, P. J. (2003) Endoproteolytic Activity of the Proteasome. *Science* **299**, 408-411.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-961.
- Madura, K., Prakash, S., and Prakash, L. (1990) Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene *RAD6* that encodes a ubiquitin conjugating enzyme, increases in response to DNA damage and in meiosis but remains constant during the mitotic cell cycle. *Nucleic Acids Res.* **18**, 771-778.
- Madura, K., Dohmen, R.J., and Varshavsky, A. (1993) N-recognin/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway. *J Biol Chem* **268**, 12046-12054.
- Majno, G., and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-16.
- Martinez-Benitez, E., Stolz, A., Becher, A. and Wolf, D.H. (2011) Mnl2, a novel component of the ER associated protein degradation pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **414**, 528-532.
- McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D., and Frydman, J. (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol.* **7**, 736-741.
- Medicherla, B. S. (2004) A genomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies multiple new gene products essential for protein quality control of the endoplasmic reticulum and degradation: The role of Dsk2p, Rad23p and Yos9p. Dissertation, Universität Stuttgart
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., and Wolf, D. H. (2004) A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* **5**, 692-697.
- Mehnert, M., Sommer, T., and Jarosch, E. (2010) ERAD ubiquitin ligases: multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum. *Bioessays.* **32**, 905-913.

- Messick, T. E., Russell, N. S., Iwata, A. J., Sarachan, K. L., Shiekhattar, R., Shanks, J. R., Reyes-Turcu, F. E., Wilkinson, K. D., and Marmorstein, R. (2008) Structural basis for Ubiquitin recognition by the Otu1 ovarian tumor domain protein. *J Biol Chem* **283**, 11038-11049.
- Metzger, M. B., Maurer, M. J., Dancy, B. M., and Michaelis, S. (2008) Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J Biol Chem* **283**, 32302-32316.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-772.
- Meyer, H. H., Wang, Y., and Warren, G. (2002) Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J* **21**, 5645-5652.
- Misselwitz, B., Staeck, O., and Rapoport, T. A. (1998) J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences, *Mol Cell* **2**, 593-603.
- Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B. C., and Botstein, D. (1982) Cold-sensitive cell-division cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**, 547-563.
- Mol, F., Mol, B.W., Ankum, W.M., Van Der Veen, F., and Hajenius, P.J. (2008) Current evidence on surgery, systemic methotrexate and expectant management in the treatment of tubal ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* **14**, 309-319.
- Molinari, M. (2007) N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* **3**, 313-320.
- Montelone, B. A., Prakash, S., and Prakash, L. (1981) Recombination and mutagenesis in *rad6* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for multiple functions of the *RAD6* gene. *Mol Gen Genet* **184**, 410-415.
- Morgan, S. L., and Baggott, J. E. (2010) Folate supplementation during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **28**, 102-109.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (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., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J., and Sambrook, J. F. (1992) A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *Embo J* **11**, 2583-2593.
- Morrison, A., Miller, E. J., and Prakash, L. (1988) Domain structure and functional analysis of the carboxyl-terminal polyacidic sequence of the *RAD6* protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1179-1185.
- Mullally, J. E., Chernova, T., and Wilkinson, K. D. (2006) Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain. *Mol Cell Biol* **26**, 822-830.
- Nakatsukasa, K., Huyer, G., Michaelis, S., and Brodsky, J. L. (2008) Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein. *Cell* **132**, 101-112.
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., and Sommer, T. (2005) Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* **7**, 993-998.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**, 27-43.
- Ng, D. T., Spear, E. D., and Walter, P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol.* **150**, 77-88.
- Nilsson, I. M., and von Heijne, G. (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **268**, 5798-5801.

- Nishikawa, S., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L., and Endo, T. (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* **153**, 1061-1070.
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2006) Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* **172**, 383-393.
- Olivari, S., Cali, T., Salo, K. E., Paganetti, P., Ruddock, L. W., and Molinari, M. (2006) EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* **349**, 1278-1284.
- Park, S. H. (2007) Molecular Chaperones in Protein Quality Control: From Recognition to Degradation. Dissertation, Universität Stuttgart
- Park, S. H., Bolender, N., Eisele, F., Kostova, Z., Takeuchi, J., Coffino, P., and Wolf, D. H. (2007) The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell.* **18**, 153-165.
- Patil, C., and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 349-355.
- Peters, J.-M., Walsh, M., and Franke, W. (1990) An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J.* **9**, 1757-1767.
- Peng, A., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S. P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* **21**, 921-926.
- Pickart, C. M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**, 544-548.
- Pickart, C. M. (2001) Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell.* **3**, 499-504.
- Pickart, C. M., and Eddins, M. J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* **1695**, 55-72.
- Picologlou, S., Brown, N., and Liebman, S. W. (1990) Mutations in *RAD6*, a yeast gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme, stimulate retrotransposition. *Mol Cell Biol* **10**, 1017-1022.
- Pilon, M., Schekman, R., and Romisch, K. (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation, *Embo J* **16**, 4540-4548.
- Plempner, R. K., Böhmeler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D. H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**, 891-895.
- Plempner, R. K., Egner, R., Kuchler, K., and Wolf, D. H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* **273**, 32848-32856.
- Plempner, R. K., Bordallo, J., Deak, P. M., Taxis, C., Hitt, R., and Wolf, D. H. (1999) Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retrotranslocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* **112**, 4123-4134.
- Plempner, R. K., Deak, P. M., Otto, R. T., and Wolf, D. H. (1999) Re-entering the translocon from the luminal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated Carboxypeptidase yscY species. *FEBS Lett* **443**, 241-245.
- Quan, E. M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., and Weissman, J. S. (2008) Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Cell.* **32**, 870-877.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Fröhlich, K.-U., Diamant, N. and Bar-Nun S. (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a Cytosolic Chaperone Required for Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 626-634.

- Rajagopalan, P. T., Zhang, Z., McCourt, L., Dwyer, M., Benkovic, S. J., and Hammes, G. G. (2002) Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 13481-13486.
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., and Jentsch, S. (2001) Mobilization of Processed, Membrane-Tethered SPT23 Transcription Factor by CDC48(UFD1/NPL4), a Ubiquitin-Selective Chaperone, *Cell* **107**, 667-677.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U. (1996) PROTEIN TRANSPORT ACROSS THE EUKARYOTIC ENDOPLASMIC RETICULUM AND BACTERIAL INNER MEMBRANES. *Annu Rev. Biochem.* **65**, 271-303.
- Reiss, Y., and Hershko, A. (1990) Affinity purification of ubiquitin-protein ligase on immobilized protein substrates. Evidence for the existence of separate NH₂-terminal binding sites on a single enzyme. *J Biol Chem.* **265**, 3685-3690.
- Reynolds, P., Weber, S. C., and Prakash, L. (1985) RAD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a protein containing a tract of 13 consecutive aspartates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 168-172.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegge, C., and Jentsch, S. (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, **120**, 73–84.
- Robzyk, K., and Kassir, Y. (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3790.
- Rouiller, I., Butel, V. M., Latterich, M., Milligan, R. A., and Wilson-Kubalek, E. M. (2000) A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. *Mol Cell* **6**, 1485–1490.
- Rouiller, I., DeLaBarre, B., May, A. P., Weis, W. I., Brunger, A. T., Milligan, R. A., and Wilson-Kubalek, E. M. (2002) Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat Struct Biol* **9**, 950-957.
- Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *Embo J* **20**, 1042-1050.
- Rumpf, S., and Jentsch, S. (2006) Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* **21**, 261-269.
- Rutishauser, J., and Spiess, M. (2002) Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med Wkly* **132**, 211-222.
- Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M. K., and Hartl, F. U. (2002) Molecular chaperones as modulators of polyglutamine aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci* **20**, 20.
- Sambrook, J., Frisch, E., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Press*, New York, 2nd edition
- Sato, K., Sato, M., and Nakano, A. (2003) Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 3605-3616.
- Schäfer, A., and Wolf, D. H. (2009) Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *EMBO J* **28**, 2874-2884.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A., and Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* **21**, 289-296.
- Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., and Finley, D. (2005) Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem* **386**, 725-737.
- Schnell, J. R., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2004) STRUCTURE, DYNAMICS, AND CATALYTIC FUNCTION OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 119–140.
- Schuberth, C., Richly, H., Rumpf, S., and Buchberger, A. (2004) Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep* **5**, 818-824.

- Schuberth, C., and Buchberger, A. (2005) Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* **7**, 999–1006.
- Schuberth, C. and Buchberger, A. (2008) UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2360-2371.
- Seufert, W., and Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **9**, 543-550.
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Soudant, P., Chu, F.-L. E., and Lund, E. D. (2005) Assessment of the Cell Viability of Cultured *Perkinsus marinus* (Perkinsea), a Parasitic Protozoan of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, Using SYBRgreen–Propidium Iodide Double Staining and Flow Cytometry. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**, 492–499.
- Spear, E. D., and Ng, D. T. (2003) Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. *Mol Biol Cell* **14**, 2756-2767.
- Stirling, C. J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., and Schekman, R. (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **3**, 129–142.
- Stolz, A., Schweizer, R. S., Schäfer, A., and Wolf, D. H. (2010) Dfm1 forms distinct complexes with Cdc48 and the ER ubiquitin ligases and is required for ERAD. *Traffic.* **11**, 1363-1369.
- Stolz, A., and Wolf, D. H. (2010) Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta.* **1803**, 694-705.
- Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., and Wolf, D. H. (2011) Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem Sci.* unpublished
- Su, K., Stoller, T., Rocco, J., Zemsky, J., and Green, R. (1993) Pre-Golgi degradation of yeast prepro-alpha-factor expressed in a mammalian cell. Influence of cell type-specific oligosaccharide processing on intracellular fate. *J. Biol. Chem.* **268**, 14301–14309.
- Sung, P., Higgins, D., Prakash, L., and Prakash, S. (1988) Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *EMBO J.* **7**, 3263–3269.
- Sung, P., Berleth, E., Pickart, C., Prakash, S., and Prakash, L. (1991) Yeast RAD6 encoded ubiquitin conjugating enzyme mediates protein degradation dependent on the N-end-recognizing E3 enzyme. *EMBO J* **10**, 2187–2193.
- Swanson, R., Locher, M., and Hochstrasser, M. (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* **15**, 2660-2674.
- Szathmary, R., Biemann, R., Nita-Lazar, M., Burda, P., and Jakob, C.A. (2005) Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* **19**, 765-775.
- Takeuchi, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2006) Causal Links Between Protein Folding in the ER and Events Along the Secretory Pathway. *Autophagy* **2**, 323-324.
- Takeuchi, M., Kimata, Y., Hirata, A., Oka, M., and Kohno, K. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* Rot1p is an ER-Localized Membrane Protein That May Function with BiP/Kar2p in Protein Folding. *J. Biochem.* **139**, 597–605.
- Takeuchi, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Rot1 Is an Essential Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol. Cell* **19**, 3514–3525.

- Taxis, C., Hitt, R., Park, S. H., Deak, P. M., Kostova, Z., and Wolf, D. H. (2003) Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* **278**, 35903-35913.
- Taylor, J. P., Hardy, J., and Fischbeck, K. H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**, 1991-1995.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102.
- Tirosh, B., Furman, M. H., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2003) Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J Biol Chem.* **278**, 6664-6672.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., and Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
- Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Canas, B., Newman, R., Rabouille, C., Pappin, D., Freemont, P., and Kondo, H. (2002) VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol* **159**, 855-866.
- Urlaub, G., and Chasin, L. A. (1980) Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci* **77**, 4216-4220.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36-44.
- Varshavsky, A. (1992) The N-end rule. *Cell* **69**, 725-735.
- Varshavsky, A. (1996a) The N-end rule. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **60**, 461-478.
- Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cell* **2**, 13-28.
- Vashist, S., Kim, W., Belden, W.J., Spear, E.D., Barlowe, C., and Ng, D.T. (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., and Ng, D. T. (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* **165**, 41-52.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R. J. (2000) Proteasomal Proteomics: Identification of Nucleotide-sensitive Proteasome-interacting Proteins by Mass Spectrometric Analysis of Affinity-purified Proteasomes. *Mol Biol Cell* **11**, 3425-3439.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., Koonin, E. V., and Deshaies, R. J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D., and Lithgow, T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**, 567-571.
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T. (2001) Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *Embo J* **20**, 3124-3131.
- Wang, Y., Satoh, A., Warren, G., and Meyer, H. H. (2004) VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *J. Cell Biol.* **164**, 973-978.
- Wang, S., and Ng, D. T. W. (2010) Evasion of Endoplasmic Reticulum Surveillance Makes Wsc1p an Obligate Substrate of Golgi Quality Control. *Mol Biol Cell* **21**, 1153-1165.
- Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127.

- Weber-Ban, E. U., Reid, B. G., Miranker, A. D., and Horwich, A. L. (1999) Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401**, 90-93.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438.
- Willer, M., Forte, G. M., and Stirling, C. J. (2008) Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. *J Biol Chem.* **283**, 33883-33888.
- Wolf, D. H., and Hilt, W. (2004) The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 19-31.
- Xia, Z., Webster, A., Du, F., Piatkov, K., Ghislain, M., and Varshavsky, A. (2008) Substrate-binding sites of UBR1, the ubiquitin ligase of the N-end rule pathway. *J Biol Chem.* **283**, 24011-24028.
- Xie, Y., and Varshavsky, A. (1999) The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *EMBO J* **18**, 6832-6844.
- Xie, Y., and Varshavsky, A. (2000) Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 2497-2502.
- Xu, X., Kanbara, K., Azakami, H., and Kato, A. (2004) Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue. *J Biochem.* **135**, 615-618.
- Yang, M., Omura, S., Bonifacino, J. S., and Weissman, A. M. (1998) Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J. Exp. Med.* **187**, 835-846.
- Ye, Y., Meyer, H.H. and Rapoport, T.A. (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**, 652-656.
- Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A. (2003) Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* **162**, 71-84.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T. A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841-847.
- Ye, Y. (2006) Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J Struct Biol* **156**, 29-40.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 755-764.
- Youker, R. T., Walsh, P., Beilharz, T., Lithgow, T., and Brodsky, J. L. (2004) Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol Biol Cell.* **15**, 4787-4797.
- Younger, j. M., Chen, L., Ren, H.-Y., Rosser, M. F. N., Turnbull, E. L., Fan, C.-Y., Patterson, C., and Cyr, D. M. (2006) Sequential Quality-Control Checkpoints Triage Misfolded Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Cell* **126**, 571-582.
- Zapun, A., Jakob, C. A., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. (1999) Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* **7**, R173-182.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M., and Freemont, P. S. (2000) Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* **6**, 1473-1484.

Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M. L., McCracken, A. A., Watkins, S. C., Michaelis, S., Brodsky, J. L. (2001) Hsp70 Molecular Chaperone Facilitates Endoplasmic Reticulum-associated Protein Degradation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1303-1314.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dieter H. Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung dieser Arbeit und stetige Diskussionsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Andrea Merbitz. Sie unterstützte mich durch viele Diskussionen und half bei allen Problemen. Wir haben zusammen alle Höhen und Tiefen eines Laboralltages gemeinsam durchlaufen, wodurch eine wunderbare Freundschaft entstand.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Ruth Menßen-Franz, Frau Dr. Jeannette Juretschke, Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Hilt und Frau Dr. Alexandra Stolz. Danke, dass ihr mir bei allen möglichen und unmöglichen Schwierigkeiten mit eurem fachlichen Rat zur Seite standet.

Allen meinen Kollegen am Institut bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und so manch nettes Gespräch dankbar. Besonders erwähnen möchte ich Frau Dr. Sonja Kohlmann, Frau Regina Philipp und Anna-Maria.

Für die Unterstützung meiner Projekte danke ich den Studenten Sophia Laure, Janina Preissler und Mario Jauker.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern für ihr Verständnis, ihre grenzenlose finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre, und ihre Mut machenden Worte.

Besonders möchte ich mich bei meinem Ehemann Matthias für seine Geduld, sein Verständnis für meine Arbeit und vor allem für seinen Rückhalt innigst bedanken.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Stefanie Besser
Anschrift	Geschwister-Scholl-Str. 154, 20251 Hamburg
Email	stefanie.besser@googlemail.com
Geburtsdatum	30. März 1982
Geburtsort	Bad Urach
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

STUDIUM

06/2006-12/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart; angestrebter Abschluß: Promotion
10/2001-12/2005	Studiengang Diplom Biologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart
Diplomarbeit	„Charakterisierung von neuronalen Zellen im anterioren nasalen Mesenchym“

BERUFSERFAHRUNG

06/2011-06/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart
06/2006-12/2010	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart
03/2006-04/2006	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der Universität Stuttgart
04/2004-12/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie 230 der Universität Hohenheim
02/2004-03/2004	Ungeprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik 240 der Universität Hohenheim

VERÖFFENTLICHUNGEN

2006	„Olfactory receptors and signaling elements in the Grueneberg Ganglion“, Journal of Neurochemistry, Fleischer, J.; Schwarzenbacher, K.; Besser, S.; Hass, N.; Breer, H.
2005	„A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior / dorsal region of the nasal cavity“, Journal of Neurochemistry, Fleischer, J.; Hass, N.; Schwarzenbacher, K.; Besser, S.; Breer, H.