

**Proteinqualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum:
Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten des
Abbaus missgefalteter sekretorischer Proteine**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Reiner Hitt
aus Vaihingen/Enz

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Mitberichter: PD Dr. Hans Rudolph
Tag der mündlichen Prüfung:
05. Juni 2003

Institut für Biochemie
der Universität Stuttgart
2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Zusammenfassung	6
Abstract	8
ER quality control and ER-associated protein degradation	8
Characterization and cloning of <i>der7-1</i>	10
Der1 and Der1-like proteins	11
Der1: substrate range and topology.....	11
Genetic interaction of Der1 and Ire1	12
Der1-like family proteins	13
Participation of cytosolic proteins in CPY* degradation	14
Einleitung	16
Die zelluläre Proteinqualitätskontrolle	16
Proteinfaltung im Zytosol.....	16
Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum	17
Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum	19
Proteasomaler Abbau „zurückgehaltener“ sekretorischer Proteine.....	21
UPR („unfolded protein response“)	24
Aufgabenstellung	25
Material und Methoden	26
Enzyme, Chemikalien und Geräte	26
Chemikalien	26
Geräte	26
Antikörper	27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>-Stämme	27
<i>Escherichia coli</i>-Stämme	29
Plasmide	29
Synthetische Oligonukleotide	31
Wachstum und Konstruktion von Hefestämmen	32
Molekularbiologische Methoden und Plasmidkonstruktion	35
Biochemische Methoden	37
Antikörperproduktion + Affinitätsreinigung	37
Immunodetektion von Proteinen	38
Cycloheximid Chase Analyse.....	38
Pulse Chase Analyse.....	38
CPY Aktivitätstest	39

Indirekte Immunofluoreszenz.....	39
Spheroblastieren und Proteaseschutz	40
Deglykosylierung von Proteinen.....	40
Kolonie-PCR.....	41
Southern-Blot	41
Ergebnisse.....	42
Klonierung und Charakterisierung des <i>der7-1</i> Mutantenallels	42
Wechsel des Stammhintergrundes zu W303	42
<i>Der7-1</i> verändert das Molekulargewicht glykosylierter Proteine	43
Identifizierung des <i>der7-1</i> Lokus	44
Komplementation von <i>der7-1</i> durch Expression von Glukosidase I	45
Meiotische Kartierung von <i>DER7</i>	46
Genetische Interaktion von <i>Der7</i> und <i>Ire1</i>	47
Eigenschaften von <i>Der1</i> und von zu <i>Der1</i> homologen Proteinen	48
Substratspektrum von <i>Der1</i>	48
Spezifische Antikörper gegen <i>Der1</i>	50
Bestimmung der Topologie von <i>Der1</i>	51
Charakteristika des Aminoterminus	51
Orientierung hydrophiler <i>Der1</i> Segmente.....	52
Lokalisierung des Carboxyterminus	53
Biologische Aktivität modifizierter <i>Der1</i> Proteine.....	55
Suche nach Bindungspartnern von <i>Der1</i>	57
Sequenzierung der Allele <i>der1-1</i> und <i>der1-2</i>	57
Temperatursensitivität von <i>der1-2 Δire1</i> Doppelmutanten.....	58
Suppression der Temperatursensitivität von <i>der1-2 Δire1</i> Mutanten	58
Datenbanksuche nach zu <i>Der1</i> homologen Proteinen	61
Ydr411c/Dfm1 gehört zur Familie „ <i>Der1</i> -ähnlicher“ Proteine.....	63
Computergestützte Analyse des Carboxyterminus von <i>Dfm1</i>	63
Lokalisierung von <i>Dfm1</i>	64
Orientierung des Carboxyterminus	65
Phänotypen der <i>Δdfm1</i> Nullmutante	65
<i>Dfm1</i> und <i>Ire1</i> zeigen keine genetische Interaktion	65
Abbau der ERAD Substrate <i>Sec61-2</i> und <i>CPY*</i>	66
Heterologe Expression des <i>C. elegans</i> Proteins R151.6 in Hefe	67
Einfluss von zytosolischen Chaperonen auf die Degradation von <i>CPY*</i>	67
Abbau des ERAD Substrats <i>CPY*</i>	68
Diskussion	69
Klonierung und Charakterisierung des <i>der7-1</i> Mutantenallels	69
Eigenschaften von <i>Der1</i> und von zu <i>Der1</i> homologen Proteinen	71

Substratspektrum und Topologie von Der1	71
Suche nach Bindungspartnern von Der1	73
Der1 homologe Proteine.....	74
Einfluss von zytosolischen Chaperonen auf die Degradation von CPY*	76
Literaturverzeichnis	78
Anhang	93
Sequenzierung von <i>der1-1</i> und <i>der1-2</i>	93
BlastP.....	94
Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine.....	95
Veröffentlichungshinweise.....	96

Abkürzungen

AAA	„ATPase associated with a variety of cellular activities“
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
CM	synthetisches Vollmedium
CPY	Carboxypeptidase yscY
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmatisches Retikulum assoziierter Abbau
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HRPO	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin Klasse G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
min	Minuten
MV	Mineralmedium
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
PrA	Proteinase yscA, Pep4
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
YPD	Glukose Vollmedium

Zusammenfassung

Damit eukaryontische Zellen sich vor Schäden durch die Aggregation ungefalteter Proteine schützen können, haben sie Qualitätskontrollsysteme entwickelt, welche die Faltung von Proteinen überwachen und gegebenenfalls deren Abbau auslösen. Speziell das endoplasmatische Retikulum, der Faltungsort von Proteinen des sekretorischen Systems, besitzt dazu ein komplexes Netzwerk faltungsunterstützender und kontrollierender Proteine. Sekretorische Proteine, die ihre endgültige räumliche Konformation trotzdem nicht erlangen, werden dem Ubiquitin-Proteasom-System zum Abbau zugeführt. Dieser Prozess wird im Allgemeinen mit ER-Degradation oder ER-assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei zur endoplasmatischen Proteinqualitätskontrolle gehörende Themengebiete bearbeitet: Als erstes wurde die Klonierung des bisher unbekanntes *DER7* Gens mit Hilfe der isolierten ERAD Mutante *der7-1* durchgeführt. Danach erfolgte eine weitergehende Charakterisierung des Der1 Proteins und der Vergleich mit den Der1-Homologen Ydr411c (*S. cerevisiae*) und R151.6 (*C. elegans*). Zuletzt wurde der Einfluss einiger zytosolischer Chaperone auf den Abbau des ERAD Modellsubstrats CPY* untersucht.

Die bisher nicht charakterisierte ERAD Mutante *der7-1* bewirkt einen verlangsamten Abbau der ERAD Substratproteine CPY* und PrA*. Zusätzlich ist die Beweglichkeit dieser Proteine im elektrischen Feld verringert. Es konnte gezeigt werden, dass dies auf eine defekte Prozessierung der N-Glykoside im endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen ist. Durch Kreuzen des *der7-1* Allels mit Nullmutanten von Glukosidase I und II, durch Komplementation mit plasmidkodierter Glukosidase I und durch meiotische Kartierung wurde gefunden, dass *DER7* mit *CWH41* identisch ist. *CWH41* kodiert für das Enzym Glukosidase I, welches bei der Prozessierung der Oligosaccharide im endoplasmatischen Retikulum einen terminalen α 1,2-Glukoserest entfernt. Korrekt getrimmte Oligosaccharide scheinen daher für eine effiziente Proteindegradation notwendig zu sein. Das bestätigt sich durch den, für Doppelmutanten des ERAD und der „unfolded protein response“ (UPR) typischen, temperaturabhängigen Wachstumsdefekt von *der7-1 Δ ire1* Mutanten.

Das Protein Der1 wurde schon in früheren Arbeiten als eine Komponente der ERAD-Maschinerie identifiziert. Bisher wurde jedoch eine Beteiligung nur am Abbau einiger löslicher missgefalteter Proteine nachgewiesen. Durch den Vergleich des Der1 abhängigen Abbaus von löslicher CPY* und membranständigem CTG* (CPY*-Transmembrandomäne-GFP) konnte nun gezeigt werden, dass die Funktion von Der1 unabhängig von der Missfaltung ist und sich wahrscheinlich auf die Degradation löslicher Proteine beschränkt.

Eine topologische Charakterisierung von Der1 zeigte, dass der N- und der C-Terminus im Zytosol lokalisiert sind und Der1 insgesamt vier Transmembrandomänen besitzt. Es wurde außerdem gefunden, dass Der1 sehr empfindlich auf Veränderungen am Protein reagiert. Einzig kleinere Modifikationen des C-Terminus, wie das Einfügen eines einzelnen HA-Epitops oder

einer N-Glykosylierungs-Konsensussequenz, erhalten die Funktionalität des Proteins.

Um potentielle Interaktionspartner von Der1 zu finden, wurde nach High-Copy-Suppressoren der Temperatursensitivität von *der1-2 Δire1* Doppelmutanten gesucht. Es wurden 19 Genbankplasmide erhalten, die im Genbankinsert weder *DER1* noch *IRE1* enthielten. Ihre Wirkungsweise ist jedoch möglicherweise indirekt, da der Abbau von CPY* durch ihre Expression in *der1-2* Mutanten nicht wiederhergestellt wurde.

Die fortschreitende Genomsequenzierung ermöglichte inzwischen die Identifizierung einer „Der1-ähnlichen“ Familie mit mehr als 15 Vertretern aus den unterschiedlichsten Organismen. Zwei dieser homologen Proteine sind Ydr411c aus *S. cerevisiae* und R151.6 aus *C. elegans*. Das Der1 homologe Protein Ydr411c wurde wegen seiner Zugehörigkeit zur „Der1-ähnlichen“ Familie Dfm1 (Der1-like family member) benannt. Ebenso wie Der1, besitzt Dfm1 einen zytosolischen C-Terminus und ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Im Gegensatz zur *Δder1 Δire1* Doppelmutation, führt die *Δdfm1 Δire1* Doppeldeletion jedoch nicht zu temperatursensitiven Hefestämmen. Des Weiteren konnte nur ein äußerst schwacher Einfluss von Dfm1 auf den Abbau des ERAD Substrats CPY* festgestellt werden. Das *C. elegans* Protein R151.6 hingegen, scheint dieselbe Funktion wie Der1 der Hefe auszuüben. Seine heterologe Expression in *Δder1 Δire1* Doppelmutanten hob die konditionale Letalität dieses Stamms auf. Das deutet darauf hin, dass die Funktion von Der1 auch in höheren Organismen konserviert ist.

Als weiteres stellte sich die Frage ob die zytosolischen Chaperone der Hsp90 und Hsp100/Clp am Abbau löslicher ERAD Substrate beteiligt sind. Die in dieser Arbeit getesteten *Δhsc82*, *Δhsp82*, *Δsti1*, *Δsba1* und *Δhsp104* Nullmutanten zeigten jedoch keinen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit von CPY*. Ob zytosolische Chaperone generell nur beim Abbau von Membransubstraten eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Abstract

ER quality control and ER-associated protein degradation

The quality control of newly synthesized proteins is essential for a cell. It prevents aggregation of unfolded protein domains and ensures that proteins acquire their native conformation.

The endoplasmic reticulum in eukaryotic cells is the organelle where all secretory and membrane proteins have to fold into their native structure. Therefore, it occupies an elaborate chaperone and quality control system supporting and monitoring folding of proteins. Proteins, which fail to fold properly, are targeted for destruction by the ubiquitin-proteasome system (ER-associated degradation, ERAD).

The exact mechanisms, how the proteins in the ER fold, are still poorly understood. Up to now, the folding and quality control of glycoproteins in mammals is examined best. Initially attached N-linked oligosaccharides are trimmed by the action of the ER-resident glucosidases I and II resulting in the $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ intermediate structure. This structure is then recognized by the lectins calnexin and calreticulin, which in turn attract the protein disulfide isomerase homologue ERp57. The concerted action of these chaperones assists folding of substrate proteins into their native conformation. A second round of glucosidase II action ultimately cleaves the remaining terminal glucose residue. The folded protein is now free to leave the ER. However, if it is still not completely folded, the enzyme UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) binds and adds back a glucose residue to the $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide making the protein again a substrate of the calnexin/calreticulin system. Ultimate cleavage of the innermost mannose residue of $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ by the slow action of α 1,2-mannosidase triggers the exit out of the folding cycle. The unfolded protein is then targeted for degradation by lectins like EDEM. Although the calnexin/calreticulin-UGGT system is not known in yeast, the action of yeast α 1,2-mannosidase and the EDEM homologue Htm1/Mnl1 have found to be necessary for the efficient degradation of misfolded glycoproteins.

Furthermore, folding and quality control of secretory and membrane proteins involves the action of additional ER resident folding enzymes. Some of them are typical chaperones like BiP (Kar2 in yeast), Scj1, Jem1 and Lhs1. Others proteins like Pdi1, Eps1, Shr3 are more specific and take part in the quality control of only a subset of proteins.

The quality control of secretory membrane proteins needs the action of additional cytoplasmic chaperones. Generally involved in folding seem to be the heat shock proteins of the cytoplasmic Hsp70 family. They bind to hydrophobic patches of virtually all newly synthesized proteins in the cytosol, thereby preventing their aggregation. Other cytoplasmic chaperones are more specialized. In mammalian cells, the ATPases of the Hsp90 family are mainly involved in the maturation of kinases and hormone receptors. The association of different Hsp90 cofactors Hsp90s seem to regulate their substrate specificity and function. Recent findings indicate, that

interaction of Hsp90s with the cofactors Hop (Sti1) and p23 (Sba1) folds a bound substrate and keeps it in an activated conformation. However, the association of Hsp90 proteins with BAG-1 and CHIP targets the same substrate for proteasomal destruction.

The protein Hsp104, another highly specialized chaperone of the cytosol, is a member of the Hsp100/Clp family. Its function is essential for stress tolerance after extreme heat shock. Together with the Hsp70 member Ssa1 and the Hsp40 protein Ydj1, it resolves and refolds protein aggregates after heat denaturation. Moreover, Hsp104 is also able to modulate the conformation of a yeast prion protein.

The secretory proteins that are targeted for proteasomal degradation most probably exit the ER through the Sec61 translocon. The exact mechanism how these proteins enter the translocation channel is not yet known. While membrane proteins could enter the retrotranslocon by lateral gating, similar to the membrane integration process during ER import, soluble proteins may be targeted to the channel by additional factors, which then switch the translocon to retrotranslocation. A protein that may play a role in this process is Der1. However, its function is still unknown. So far, its solely found to contribute to degradation of the soluble ERAD substrates CPY*, PrA* and KNH_t. In the cytosol these substrates are polyubiquitinated by the action of ubiquitin-conjugating (E2) and ubiquitin-protein-ligation enzymes (E3). For example, ubiquitination of CPY* requires the E2 proteins Ubc1, Ubc6 and Ubc7, and the E3 complex enzymes Hrd3-Der3/Hrd1. Polyubiquitination of degradation substrates seems to support different functions: i) there is data indicating, that it prevents backsliding into the translocation channel by steric hindrance ii) it may also be prerequisite for binding to the Cdc48-Ufd1-Npl4 protein complex and iii) it has been found that the minimum chain length for efficient substrate binding and degradation by the proteasome are four ubiquitin moieties. It is further speculated, that binding of degradation substrates by the AAA-ATPase Cdc48 and its complex partners Ufd1 and Npl4 lead to their extraction either out of the retrotranslocon or to the removal from the ER membrane. Subsequent delivery to the proteasome is accompanied by deglycosylation of glycoproteins by the PNGase Png1. The 26S proteasome binds and de-ubiquitinates the polyubiquitinated substrates at its 19S cap. Finally, the degradation substrates enter the cavity of 20S core particle. There they are proteolytically cleaved by proteasomal subunits with tryptic, chymotryptic and PGPH-like activity.

Mutations in components of the ER quality control system severely impair the degradation of ER-associated degradation substrates by the proteasome. This can be either direct, by preventing their delivery to the ERAD machinery or more indirect, by disturbing steps of the quality control system. In most mutants nondegraded ERAD substrates accumulate in the ER and cause induction of cellular stress. Increasing numbers of unfolded proteins compete for Kar2 binding with monomeric Ire1 protein, the inactive form of the ER stress sensor. Loss of Kar2 activates the Ire1 kinase by dimerization and autophosphorylation. This leads to the induction of the unfolded protein response (UPR) by the splicing of *HAC1*^u mRNA and

subsequent translation of the Hac1 transcription-factor. The UPR induction results in additional synthesis of chaperones, components of the ERAD system and secretory pathway proteins to promote folding and degradation of unfolded proteins. Indeed, UPR and ERAD are tightly linked processes. Simultaneous mutations in both pathways results in cell death when the cells are exposed to additional stress. This is probably caused by the inability of double mutants defective in ERAD and UPR to cope with misfolded and/or aggregated proteins.

The following chapters describe the cloning and characterization of the yet unknown ERAD gene *DER7* using the *der7-1* mutant. Furthermore, they give new insight into the structure and the function of the ERAD component Der1 and its homologues proteins Ydr411c/Dfm1 from *S. cerevisiae* and R151.6 from *C. elegans*. Finally, the participation of the cytoplasmic chaperones Hsp104, Hsp90 and Hsp90 complex partners in the degradation of the soluble ERAD substrate CPY* is examined.

Characterization and cloning of *der7-1*

The mutant *der7-1* was recently isolated in a screen for strains which are defective in degradation of the short-lived proteins CPY* and PrA*. Another phenotype of the mutant strain is an increased molecular mass of these proteins in SDS-PAGE. This altered electrophoretic mobility was also observed when the proteins Pep4 and Wbp1 were analysed, whereas the size of unglycosylated Sec61 protein was not changed. This suggested N-linked glycosylation as the origin of the change in molecular mass. Indeed, deglycosylation of CPY* isolated from a *der7-1* strain with endoglucosidase F decreased the molecular size to that of CPY* isolated from a wild type strain. There are two possible explanations for this increased molecular mass of CPY*: first, the protein leaves the ER and therefore gets modified in the golgi by addition of mannose residues, or second, trimming of N-linked glycans in the ER is incorrect. Golgi type mannosylation of CPY* in *der7-1* alleles was excluded by the absence of α 1,6-linked mannose antigenic material. Therefore, the modification must have happened in a pre-golgi compartment. Known ER resident proteins interfering with N-linked glycosylation are components of the oligosaccharyl transferase complex (OST), glucosidases and mannosidases. In yeast, mutants of the oligosaccharyl processing enzymes glucosidase I, encoded by *CWH41* (calcofluor white hypersensitivity), glucosidase II, encoded by *ROT2* (reversal of tor2 lethality), and α 1,2-mannosidase (Mns1) cause an increase of the molecular mass of glycoproteins. Subsequent western blot analysis showed that the mobility of Wbp1 and Pep4 proteins was affected equally in *der7-1* and Δ *cwh41* cells, whereas in a Δ *rot2* mutant the molecular mass of these proteins was shifted to a lesser extent. Additionally, the increase in size of these proteins was maintained in a heterozygous *der7-1/DER7 CWH41/Δcwh41* diploid strain. This was a first indication that *der7-1* is allelic to *CWH41*, the glucosidase I encoding gene. Further evidence was obtained by the expression of plasmid encoded glucosidase I. Constitutive expressed glucosidase I restored the mobility of CPY* in *der7-1* strains at least partially to wild type levels. Finally, meiotic

mapping of *der7-1* demonstrated that it is, like *CHW41*, a chromosomal neighbour of *TRP5*. Spores of 38 tetrads, obtained from a heterozygous *der7-1/DER7 TRP5/Δtrp5* diploid strain, displayed either the *der7-1* phenotype or geneticin resistance. This demonstrated the genetic linkage of *der7-1* and *TRP5*. In summary these results imply that *DER7* and *CWH41* are identical genes. Therefore, the *der7-1* allele affects the trimming of N-linked oligosaccharides, which is visualized by the increased size of glycoproteins in SDS-PAGE. The resulting incorrect oligosaccharide structure might impair the interaction of glycoproteins with components of the quality control and degradation machinery in general. As a consequence, a delay in ER-associated degradation can be observed.

By using a *der7-1 Δire1* double mutant it could be demonstrated that impaired oligosaccharide trimming leads to increased ER-stress. The inability of this mutant to induce the unfolded protein response (UPR), resulted in a strongly affected growth at elevated temperatures. This is most likely due to the incapability of this strain to compensate stress caused by inefficient folding and degradation. It is known that correct trimming of oligosaccharides is not necessary for the activity of the majority of secretory proteins. But it cannot be excluded that it might be necessary for the efficient folding of some specific glycoproteins. For instance, the synergistic effects of *Δcne1* and *kar2* mutants combined with defective glucosidase I on β 1,6-glucan content of the cell wall, suggested a role of efficient trimming by glucosidases in folding of specific glycoproteins involved in β 1,6-glucan synthesis. Interestingly, a recent report pointed out that the reduced β 1,6-glucan content of the cell wall in *Δcwh41* deletion strains is caused indirectly by decreased levels of the protein Kre6, a predicted golgi glucansynthase.

Der1 and Der1-like proteins

Der1: substrate range and topology

One of the first identified and characterized component of the ER degradation machinery was the Der1 protein. In the following years, many groups tested its involvement in degradation of different ERAD substrates. However, involvement of Der1 could be found only in degradation of the soluble substrates CPY*, PrA* and KNH_t.

The construction of a set of comparable ERAD substrates, carrying CPY* as degradation motif, allowed now to specify the role of Der1 in ER quality control in more detail. In contrast to soluble CPY*, these new substrates contain a type I membrane domain. They were obtained by c-terminal CPY* fusions of either a Transmembrane domain with an adjacent cytoplasmic GFP (green fluorescence protein) moiety (CTG*) or the transmembrane domain alone (CT*). Investigation of the degradation kinetics of CPY* and CTG* in wild type, *Δder1* and *Δcuel* mutants demonstrated the exclusive action of the Der1 protein on degradation of soluble CPY*. Besides all proteins sharing the same degradation signal – misfolded CPY* – Der1 is not participating in the degradation of membrane bound CTG* (and CT*; C. Taxis, personal

communication). This indicates that the role of Der1 in ER-quality control is not to generally recognize misfolded or unfolded protein domains during the folding or degradation process. Instead, the Der1 protein seems to have a function in serving a specific environment that is necessary for dislocation of soluble ERAD substrates into the cytoplasm and subsequently for proteasomal degradation.

Recent genome wide studies of the unfolded protein response (UPR) demonstrated, that Der1 is one of the highest upregulated proteins upon UPR induction. Despite that, not much is known about its role in the degradation process or in the cell in general.

The identification of the Der1 topology was used as a starting point to unravel its cellular function. Computer based calculations predicted a topology with four transmembrane domains (TM) for the Der1 protein and the first TM being an ER-import signal sequence. Consequently, it was analysed whether the signal sequence is cleaved off. Western blot analysis of the over expressed Der1-HA protein in the signal peptidase mutant *spc3-4* displayed no difference in Der1-HA size at permissive and restrictive temperature. This indicates that the signal sequence of Der1 is not cleaved and therefore represents the first transmembrane domain. This result was confirmed by size determination of a n-terminally triple HA tagged Der1 protein by western blotting and subsequent immunodetection.

Furthermore, the predicted transmembrane segments TM2 and TM3 of Der1 were confirmed as such by insertion of Suc2A reporter fragments, which become glycosylated when exposed to the ER-lumen. Dependent on the localization of the Suc2A fragment, the Der1 fusion protein displayed either glycosylation (D45/L46 and Y128/Y129, ER localized loops) or not (E85/N86, cytoplasmic orientation). Finally, the predicted fourth membrane domain of Der1 could be verified in two different type of experiments: introduction of a carboxyterminal N-glycosylation site as well as protease protection experiments with the Der1-HA fusion protein pointed out, that the hydrophilic c-terminal tail of Der1 faces the cytoplasm. Taking into account, that the amino acids following the third transmembrane domain (TM3) are ER-luminal (glycosylation of the Suc2A reporter fragment), a fourth TM has to be present. By summarizing these different results, a final Der1 structure with cytoplasmic n- and c-termini, separated by four transmembrane segments and alternating hydrophilic regions, emerges.

Genetic interaction of Der1 and Ire1

The former finding that the Der1 protein is highly upregulated by induction of UPR led also to the discovery, that a $\Delta der1 \Delta ire1$ double mutation has synergistic effects and leads to conditional lethality. This phenotype makes it rather easy to test the biological activity of Der1 fusion proteins. By additional measurements of the degradation kinetics of CPY* in cells expressing Der1 variants it was found that Der1 is highly sensitive to structural changes. Modification of the n-terminus by addition of a triple HA or even of a single HA epitope, inactivate the Der1 protein. Also, the insertion of the Suc2A fragment into the hydrophilic loops yield into an

infunctional Der1 protein. Nevertheless, small changes at the very c-terminus are tolerated. For example, insertions leading to the proteins Der1-G, Der1-HA and Der1-IRS do not disturb the Der1 activity. But already a double HA epitope like in the Der1-2HA protein seems to decrease the activity. These results support the idea that Der1 cooperates with ER-luminal and/or cytosolic proteins and, therefore might be involved in setting up an environment competent for retrotranslocation and/or degradation of soluble ERAD substrate proteins.

Further it could be demonstrated, that conditional lethality was not only true for a $\Delta der1 \Delta ire1$ double deletion strain, but also for a $der1-2 \Delta ire1$ double mutant. Sequencing of the $der1-2$ allele revealed a single serine to leucine exchange at position 59 (S59L) in the first ER-luminal loop near TM2 of Der1. No mutations could be found in the $der1-1$ coding region. The $der1-2 \Delta ire1$ double mutant was then used to screen for possible Der1 interacting proteins by high copy suppression of the $der1-2$ allele with a genomic library. Finally, 19 candidates with different genomic fragments were isolated, all of them suppressing lethality of the $der1-2 \Delta ire1$ strain at 37 °C. Surprisingly, the candidates suppressed the lethality of a $\Delta der1 \Delta ire1$ double deletion, too. This raised the question whether any specific $der1-2$ suppressor could be obtained at all. Indeed, introduction of these plasmids into $der1-2$ mutants could not restore degradation of CPY*. Moreover, cycloheximid chase and preliminary pulse chase analysis pointed to an increased half-life of CPY* in the $der1-2$ mutant. Possible explanations may be, that the suppressors either induce transcription of UPR regulated proteins or bind to ERAD intermediates, thereby reducing stress unspecifically. Interestingly, recent findings demonstrated the appearance of apoptotic markers when additional stress is applied to double mutants defective in ERAD and UPR. Thus, the isolated candidates might simply represent suppressors of apoptotic induction.

Der1-like family proteins

A database search with BlastP resulted in more than 20 proteins homologous to Der1. The closest 15 homologues built the Der1-like family (Pfam domain PF04511; Pfam, Sanger Institute; www.sanger.ac.uk). Among them is the *C. elegans* protein R151.6 – one of the closest Der1 orthologues – and the uncharacterized *S. cerevisiae* protein Ydr411c. Despite their weak identity (up to 25 %, similarity up to 50 %) these proteins share conserved residues mainly in their hydrophilic segments. Moreover, they display a similar topology predicted by Kyte-Doolittle hydrophobicity plots. Due to its membership in the Der1-like family the yet uncharacterized *S. cerevisiae* protein Ydr411c was named Dfm1 (Der1-like family member).

Ydr411c/Dfm1, the yeast Der1 homologue is a protein with unknown function. It consists of 341 amino acids yielding a 38 kDa protein and is therefore one of the largest Der1-like family proteins. Kyte-Doolittle analysis suggested a Der1 like topology. And indeed, protease protection experiments confirmed cytosolic localization of the Dfm1 carboxy terminus. Moreover, indirect immunofluorescence showed co-localization of the Dfm1-3HA fusion

protein and the Sec61 protein. Recent findings demonstrated that the protein Dfm1 is, like Der1, highly upregulated by induction of the UPR. Despite these similarities with Der1, Dfm1 displays enlarged cytoplasmic amino acid segments implying a different cytosolic and/or cellular function. Pulse chase analysis of CPY* degradation in $\Delta dfm1$ and $\Delta dfm1 \Delta der1$ double mutants unveiled an mildly affected turnover of the substrate. Compared to wild type and $\Delta der1$ single mutant respectively, the double mutants displayed a slightly slower degradation rate of CPY*. In addition, degradation of Sec61-2 protein was not prevented in $sec61-2 \Delta dfm1$ strains, shown by their unchanged temperature sensitivity. In fact, $\Delta dfm1 \Delta ire1$ double mutants did not display the typical growth phenotype of double mutants defective in ERAD and UPR, when exposed to temperature stress. Therefore it is possible, that the protein Dfm1 is not part of the in ER quality control system at all. Its effect on CPY* degradation would then be indirect, for instance, simply by disturbing the ER structure and/or ER related functions. Dfm1 could also take part in the destruction of a specific, yet unknown subset of ERAD substrates. However, their defective degradation should then lead to a type of ER-stress, that induces a signalling pathway different from that of Ire1/Hac1.

As mentioned above, compared to the protein Der1, Dfm1 contains extended cytoplasmic domains. Most obvious is the prolonged c-terminal tail. A closer examination of the elongated c-terminus revealed the repeated pattern FxGzGQxb (x: any amino acid, b: basic amino acid, z: acidic amino acid). Its function is not known, but it is also present in the well-examined yeast proteins Shp1, Ufd1 and Apc1. As these proteins are involved in ubiquitin regulated process, one could hypothesize that this also indicates a function of Dfm1 in ubiquitin or ubiquitin-like regulated processes.

In contrast to the yeast homologue Dfm1, the R151.6 protein (237 amino acids) of *C. elegans* is one of the closer Der1 (211 amino acids) orthologues. Size and distribution of the predicted membrane domains are very similar to yeast Der1. Indeed, plasmid encoded overexpression of R151.6 rescued the conditional lethality of a $\Delta der1 \Delta ire1$ double deletion strain at 37 °C. This suggests a Der1-like function of R151.6 in ERAD of *C. elegans*.

Participation of cytosolic proteins in CPY* degradation

Former investigations demonstrated the involvement of cytoplasmic chaperones of the Hsp70 and Hsp90 families in proteasomal turnover of the membrane proteins CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) and a mutated form of the insulin receptor. However, the soluble ERAD substrate CPY* is degraded independently of Hsp70s and Ydj1 proteins. Here it was tested whether the Hsp90 family proteins Hsc82 and Hsp82, the Hsp90 cofactors Sti1 and Sba1, or the Hsp104 chaperone are necessary for efficient degradation of the ERAD substrate CPY*. By measuring CPY* turnover in the respective null mutants, it turned out, that $\Delta hsc82$, $\Delta sti1$ and, to a lesser extent, $\Delta sba1$ mutants displayed a delayed degradation start, but then assumed wild type like degradation kinetics. One possible explanation could be the recent

finding that in higher eukaryotes HSP90 proteins regulate the stability of IRE1 α protein. The employed pulse chase conditions for measuring CPY* degradation, starvation of the cells for methionine, cysteine and nitrogen prior to the pulse, could lead to such a loss of Ire1 in the examined $\Delta hsc82$, $\Delta sti1$ and $\Delta sbal1$ mutants. This in turn would affect the protein levels of UPR controlled ERAD components, resulting in a delayed start of CPY* degradation.

In conclusion, these studies on three different aspects of the ER quality control, (i) oligosaccharide trimming by the Der7/Cwh41 protein, (ii) degradation of soluble ERAD substrates by the action of Der1 protein and (iii) the effects of cytosolic chaperones on CPY* degradation, show that the requirement for components of the degradation machinery is highly dependent on the nature of the substrate. There exists a basic degradation system which most degradation substrates share. However, the individuality of soluble, transmembrane, glycosylated or unglycosylated substrate proteins seem to require special degradation factors and/or folding enzymes, which are necessary for proper degradation.

Einleitung

Die zelluläre Proteinqualitätskontrolle

Die posttranslationale Proteinqualitätskontrolle schützt lebende Zellen vor Schäden durch entfaltete Polypeptidketten genetisch mutierter, fehlerhaft translatierter und sich schlecht faltender Proteine. Solange diese Proteine ihre funktionelle räumliche Struktur noch nicht erreicht haben, wird dabei das Gleichgewicht zwischen Faltung und Abbau von Chaperonen gesteuert (zusammengefasst in Höhfeld *et al.*, 2001). Wird die Kapazität der Faltungs- und Degradationsmaschinerie überschritten, beginnen die entfalteten Proteine zu aggregieren. Die Bildung dieser Aggregate geht oft mit der Entstehung von Krankheiten einher (Kopito und Sitia, 2000; Rutishauser und Spiess, 2002).

Messungen in Säugerzellen haben ergeben, dass ungefähr 30 % aller neu synthetisierten Proteine vom Proteasom abgebaut werden. Nur auf den ersten Blick scheint das eine Energieverschwendung zu sein. Tatsächlich nützen Zellen das aber zu ihrem Vorteil: Die erzeugten Peptide werden zur Antigenpräsentation an der Zelloberfläche verwendet. Die Zelle ist so in der Lage, Bruchstücke momentan synthetisierter (Fremd-) Proteine sehr schnell dem Immunsystem zu präsentieren. Sie kann dadurch z. B. einen Virenbefall frühzeitig signalisieren und muss nicht den altersbedingten Abbau viraler Proteine abwarten (Reits *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000).

Proteinfaltung im Zytosol

An der Proteinfaltung im Zytosol sind viele unterschiedliche Chaperone beteiligt. Zwei Hauptklassen molekularer Chaperone werden durch die Hitzeschock Proteine der Hsp70 und Hsp90 Familien repräsentiert.

Die Mitglieder der Hsp70 Chaperone Familie sind an der Faltung neu synthetisierter Proteine, am Schutz von Proteinen während und nach zellulärem Stress und an intrazellulärem Proteintransport beteiligt. Sie komplexieren dazu exponierte hydrophobe Polypeptidsegmente und verhindern dadurch deren unkontrollierte Faltung und Aggregation. Die Wechselwirkung mit dem Substrat wird dabei durch Zyklen von ATP-Bindung und -Hydrolyse gesteuert (Bukau und Horwich, 1998; Hartl, 1996).

Die Funktion der Chaperone der Hsp90 Familie scheint dagegen spezifischer zu sein. Untersuchungen in Hefe ergaben, dass die allgemeine Proteinfaltung auch durch einen totalen Hsp90 Funktionsverlust nicht beeinträchtigt wird (Nathan *et al.*, 1997). Deshalb wird ihre generelle Beteiligung an der Proteinfaltung immer noch diskutiert. Dagegen ist ihre Rolle bei zellulärem Stress und bei der Reifung von Kinasen und Steroidhormon-Rezeptoren intensiv untersucht (zusammengefasst in Buchner, 1999; Caplan, 1999). Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt zwei redundante Vertreter der Hsp90 Familie: Das konstitutiv exprimierte Protein Hsc82 und

das durch Stress induzierte Protein Hsp82. Mit der Tyrosinkinase Swe1 wurde erst kürzlich ein natürliches Hsp90 Substrat in Hefe identifiziert (Goes und Martin, 2001). Die Substratbindung der Hsp90 Chaperone wird durch Zyklen von ATP-Bindung und -Hydrolyse, sowie durch zusätzliche Wechselwirkung mit Kofaktoren wie Hop (Sti1 in Hefe) oder p23 (Sba1 in Hefe) reguliert (Chang *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1999; Young und Hartl, 2000). Während der Kofaktor Hop (Sti1) zuerst eine Wechselwirkung von Hsp40-Hsp70-Substrat Komplexen mit Hsp90 Dimeren vermittelt, bewirkt die Bindung von p23 (Sba1) und ATP das Ablösen von Hop (Sti1) und damit auch des Hsp40-Hsp70 Komplexes. Es bildet sich daraus ein Hsp90 Endkomplex, der zusätzlich zum Substratprotein, auch p23 (Sba1) und Immunophiline enthält (Chen und Smith, 1998; Grenert *et al.*, 1999; Pratt und Toft, 1997). Außer den beiden Kofaktoren Hop und p23, kann Hsp90 noch in Komplexen mit weiteren Kofaktoren vorliegen. Die Funktion der meisten Kofaktoren ist noch nicht verstanden. Einige scheinen aber um die Bindung an Hsp90 Proteine zu konkurrieren. *In vitro* Untersuchungen am Glukocorticoidhormon Rezeptor haben gezeigt, dass die Expression des Kofaktors CHIP zur Dissoziation von p23 aus dem Hsp90 Heterokomplex führt. Zusätzlich initiiert die Bindung von CHIP die Polyubiquitinierung des Substrats und macht es dadurch der Abbaumaschinerie zugänglich (Connell *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001). Einerseits wird also offenbar die Substratspezifität des Hsp90 Heterokomplexes durch Bindung an unterschiedliche Kofaktoren reguliert (Auflistung in Buchner, 1999; Caplan, 1999; Nollen und Morimoto, 2002). Andererseits scheint deren Konkurrenz das Gleichgewicht zwischen Faltung und Abbau zu regulieren (zusammengefasst in Höhfeld *et al.*, 2001).

Ein weiteres zytosolisches Chaperon ist Hsp104. Es gehört zu den ATPasen der Hsp100/Clp Familie (zusammengefasst in Schirmer *et al.*, 1996). Zwar ist das Protein Hsp104 für das Wachstum bei normaler Temperatur nicht notwendig, es ist aber essentiell um die Stresstoleranz in Hefen auch bei extrem hohen Temperaturen aufrecht zu erhalten (Hänninen *et al.*, 1999; Lindquist und Kim, 1996; Sanchez und Lindquist, 1990). Dabei unterstützt es, zusammen mit den Proteinen Ssa1 und Ydj1, Mitglieder der Hsp70 bzw. der Hsp40 Chaperon Familie, die Auflösung von Proteinaggregaten nach Hitzedenaturierung (Glover und Lindquist, 1998; Parsell *et al.*, 1994). Darüber hinaus kommt Hsp104 auch eine Rolle bei der Modulierung der Konformation von zytoplasmatischen Prion-Proteinen zu (Chernoff *et al.*, 1995; Moriyama *et al.*, 2000; Schirmer und Lindquist, 1997). Interessanterweise kann Hsp104 unter bestimmten Bedingungen mit denselben Kofaktoren wie die Hsp90 Chaperone wechselwirken. Die biologische Funktion dieser Interaktion ist bisher aber nicht bekannt (Abbas-Terki *et al.*, 2001).

Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum

Proteine, die ihren Bestimmungsort im sekretorischen System haben, werden mit einer Signalsequenz im Zytosol synthetisiert (Blobel und Dobberstein, 1975). Sie werden

anschließend entweder co- oder posttranslational durch das Sec61 Translokon, gebildet aus 3-4 Einheiten des Protein-Heterotrimers Sec61-Sss1-Sbh1, ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (zusammengefasst in Johnson und van Waes, 1999). Da die Größe des Sec61 Translokationskanals für den Transport gefalteter Proteine nicht ausreicht, erreichen sie das ER in entfaltetem Zustand (Beckmann *et al.*, 1997; Hamman *et al.*, 1997; Hanein *et al.*, 1996). Daher sind die Faltung und die Kontrolle der strukturellen Integrität sekretorischer und membranständiger Proteine eine der Hauptfunktionen des endoplasmatischen Retikulums. Es besitzt dazu ein umfangreiches Chaperon System, welches die effiziente Faltung der Proteine bis zum Erlangen ihrer funktionellen räumlichen Struktur unterstützt (zusammengefasst in Fewell *et al.*, 2001). Proteine die sich nicht falten, werden im ER zurückgehalten und entweder dem proteasomalen Abbau zugeführt oder als unlösliche Proteinablagerungen deponiert (zusammengefasst in Kopito und Sitia, 2000; Rutishauser und Spiess, 2002).

Schon während der Translokation neu synthetisierter Proteine, werden im ER exponierte hydrophobe Polypeptidsegmente von ER-Chaperonen wie Kar2, Lhs1 und Sil1 gebunden. Diese Wechselwirkung unterstützt den Import ins ER und ebenso eine korrekte und effiziente Faltung (Brodsky, 1996; Craven *et al.*, 1996; Tyson und Stirling, 2000). Zeitgleich überträgt der Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST) Oligosaccharid Vorläufermoleküle auf Asparagin Reste der N-Glykosylierung Konsensussequenz Asp-X-Ser/Thr im entstehenden Protein. Ihre hydrophile und voluminöse Struktur erzwingt eine Lokalisierung der angrenzenden Aminosäuren an der Proteinoberfläche. Die N-gebundenen Oligosaccharide werden anschließend von den ER residenten Glukosidasen I und II schrittweise modifiziert. Diese strukturelle Änderung ermöglicht die Bindung spezieller Faltungsenzyme wie z. B. der Lektine Calnexin und Calreticulin. Man hat festgestellt, dass an der Glykosylierungsstelle eine kompaktere Faltung der Polypeptidkette vorliegt. Eine weitere Stabilisierung der Proteinkonformation wird durch Oxidoreduktasen der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) Familie erreicht. Sie besitzen neben ihrer Hauptaktivität, Katalyse der Disulfid-Brückenbildung durch Oxidation und deren Isomerisierung, zusätzlich auch Chaperone Aktivität (Tsai *et al.*, 2001). Weitere Enzyme, deren Beteiligung an der Faltung postuliert wird, sind die Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) des endoplasmatischen Retikulums. Sie katalysieren die cis/trans Isomerisierung von Peptidbindungen nach der Aminosäure Prolin (Lang *et al.*, 1987).

Um die korrekte Faltung membranständiger sekretorischer Proteine zu gewährleisten, werden zusätzlich zu ER-luminalen, auch zytosolische Chaperone benötigt. Daher sind z. B. die Chaperone der zytosolischen Hsp70 und Hsp90 Familien an der Faltung und Maturierung zytoplasmatischer Domänen von CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), einem Chloridionen-Kanal der Plasmamembran, beteiligt (Loo *et al.*, 1998; Meacham *et al.*, 1999).

Man kann sich nun leicht vorstellen, dass die Wechselwirkung der Faltungsmaschinerie mit Polypeptiden auch gleichzeitig deren momentanen Faltungszustand wiedergibt. Welche Rolle

dem Faltungszustand bei der Proteinqualitätskontrolle zukommt, wird im folgenden Kapitel am Beispiel glykosylierter Proteine deutlich.

Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum

Die Beobachtung, dass nicht assemblierte Membrankomplexuntereinheiten im ER zurück gehalten werden, machte zum ersten mal auf die Gegenwart eines Proteinqualitätskontroll-Systems aufmerksam (Hurtley *et al.*, 1989). Es hat sich gezeigt, dass diese Proteine das KKXX ähnliche Rückhaltemotiv RXR exponieren (Jackson *et al.*, 1993). Man geht davon aus, dass durch die Zusammenlagerung der Komplexuntereinheiten das Rückhaltemotiv maskiert und dadurch der Komplex an seinen Bestimmungsort entlassen wird (Zerangue *et al.*, 1999).

Heute weiß man, dass das ER-Qualitätskontrollsystem die Zelle vor Schäden durch ungefaltete und nicht assemblierte sekretorische Proteine schützt. Dazu werden diese Proteine bis zum Erlangen einer exportkompetenten Konformation im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten. Proteine, die ihre native Struktur nicht erreichen, werden dem proteasomalen Abbau zugeführt. Ein weiteres Signal zur Rückhaltung von ungefalteten Proteinen kann die Bindung von Chaperonen an exponierte hydrophobe Polypeptide darstellen. Tatsächlich sind die Proteine BiP (Hammond und Helenius, 1994) und PDI (Reddy und Corley, 1998) sowie das Calnexin/Calretikulin-UGGT-System (zusammengefasst in Ellgaard und Helenius, 2001; Parodi, 2000) an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt.

Gut untersucht ist der Rückhaltemechanismus entfalteter glykosylierter Proteine in Säugerzellen. Die ER residenten Glukosidasen I und II entfernen die terminalen Glukosereste glykosylierter Proteine relativ schnell von der $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ zur $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ Struktur (Helenius und Aebi, 2001). Oligosaccharide dieser speziellen Struktur werden von den Lektinen Calnexin und Calretikulin erkannt und gebunden. Ihre Bindung rekrutiert zusätzlich Oxidoreduktasen der PDI Familie (Hammond *et al.*, 1994; Oliver *et al.*, 1999). Konnte das sekretorische Protein bis zur Entfernung des dritten und letzten terminalen Glukoserests ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) durch Glukosidase II in seine endgültige Konformation gefaltet werden, kann es jetzt das ER verlassen. Ist es jedoch immer noch entfaltet, bindet das Enzym UDP-Glukose:Glykoprotein Glukosyltransferase (UGGT) und addiert erneut einen Glukoserest an das Oligosaccharid (Zapun *et al.*, 1997). Das noch nicht vollständig gefaltete Protein wird dadurch erneut von Calnexin/Calretikulin gebunden. Es wird also im ER zurückgehalten und einem erneuten Faltungszyklus unterworfen (zusammengefasst in Ellgaard und Helenius, 2001; Parodi, 2000). Es wird angenommen, dass die Verweildauer der Proteine im Calnexin/Calretikulin-UGGT-System von der Aktivität der α 1,2-Mannosidase bestimmt wird („Timer-Hypothese“) (Ellgaard *et al.*, 1999; Jakob *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 1999). Obwohl in Hefe das Calnexin/Calretikulin-UGGT-System unbekannt ist, scheint auch dort die Verweildauer von Glykoproteine in der Faltungsmaschinerie durch die α 1,2-Mannosidase gesteuert zu werden. Lektine wie EDEM (Htm1/Mnl1 in Hefe) erkennen die entstandene

$\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ Oligosaccharidstruktur und führen die gebundenen Proteine dem Abbau zu (Hosokawa *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2001; Nakatsukasa *et al.*, 2001). Die Abwesenheit von Mannosidase I oder dem Lektin Htm1/Mnl1 in *S. cerevisiae* führt zu einem verzögerten Abbau des ERAD Substrats CPY* (Jakob *et al.*, 2001; Knop *et al.*, 1996b).

Wie die Faltung nichtglykosylierter Proteine überwacht wird, ist noch unklar. Da aber auch die Faltung glykosylierter Proteine oftmals nicht von ihrem Glykosylierungsstatus abhängt (Esmon *et al.*, 1984; Jakob *et al.*, 1998b; Simons *et al.*, 1998), ist zu erwarten, dass es alternative Möglichkeiten der Erkennung einer Missfaltung gibt. Die Oxidoreduktase Pdi1 wird z. B. zum effizienten Abbau von pro- α -Faktor benötigt, obwohl dieser keine Disulfidbrücken enthält (Gillece *et al.*, 1999). Weitere Beispiele sind das Pdi1 homologe Protein Eps1, es verhindert die Sekretion der missgefalteten Plasmamembran H^+ -ATPase Pma1 (Wang und Chang, 1999), und das an der Sekretion von Aminosäure-Permeasen beteiligte Protein Shr3 (Ljungdahl *et al.*, 1992). Weitere proteinspezifische Faktoren der endoplasmatischen Qualitätskontrolle sind in Ellgaard *et al.* (1999) aufgeführt.

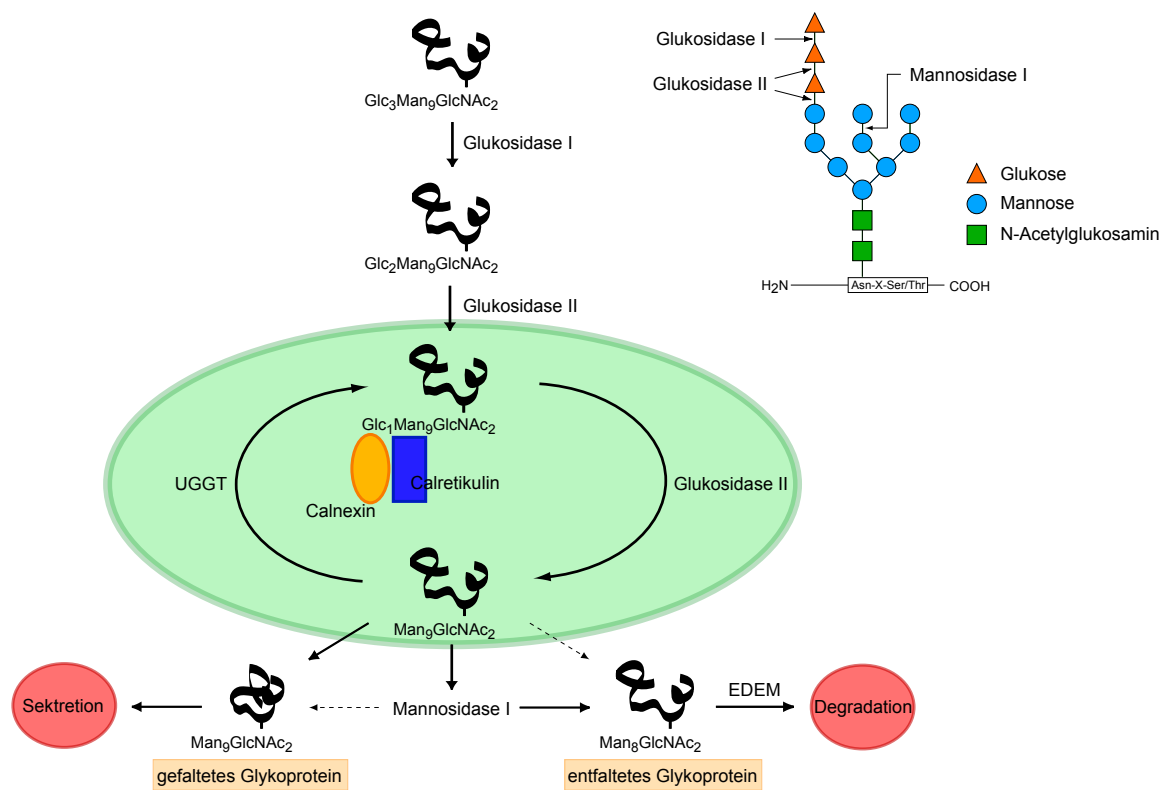


Abbildung 1: **Zeitfenster der Degradation von Glykoproteinen in höheren Eukaryonten.** N-gebundenen Oligosaccharide werden im ER an die Aminosäure Asparagin der Asn-X-Ser/Thr Konsensussequenz an neu synthetisierte Glykoproteine angehängt. Die endständigen Glukosereste werden durch die enzymatische Aktivität der Glukosidasen I und II entfernt. Ungefaltete Proteine gelangen in einen Zyklus aus Anheftung eines Glukoserests durch UDP-Glukose:Glykoprotein Glukosyltransferase (UGGT) und Abspaltung durch Glukosidase II. Die monoglykosylierten Proteine werden von den Chaperonen Calnexin und Calretikulin gebunden und dadurch im ER zurückgehalten. Gefaltete Proteine verlassen den Zyklus und gelangen an ihren Bestimmungsort. Länger zyklierende ungefaltete Proteine werden von der Mannosidase I prozessiert und dadurch für den Abbau markiert. Lektine wie EDEM (Htm1/Mnl1 in Hefe) binden an diese Struktur und führen die Proteine zur ER-assoziierten Degradation.

Auch nicht mutierte, sich möglicherweise zu langsam faltende Proteine können von der Qualitätskontrolle erfasst und dem Abbau zugeführt werden. Das bekannteste Beispiel ist hierfür der Chloridionen-Kanal CFTR. Tatsächlich erreichen nur ca. 25 % des synthetisierten Wildtypproteins die Plasmamembran einer Epithel Zelle, der Rest wird proteasomal abgebaut. Zusätzliche Mutationen in CFTR führen zur völligen Rückhaltung und Degradation (Ward und Kopito, 1994; zusammengefasst in Kopito, 1997). Die wohl bekannteste Mutation CFTR Δ F508 verursacht die Erbkrankheit Mukoviszidose (Zystische Fibrose) (zusammengefasst in Rutishauser und Spiess, 2002).

Einige Viren nützen die Mechanismen der Qualitätskontrolle um die Funktion des Immunsystems zu beeinträchtigen. Zum Beispiel stört der Zytomegalovirus die Antigenpräsentation durch MHC class I Komplexe an der Plasmamembran, indem er den Abbau der schweren Ketten dieser MHC class I Komplexe durch ER-assoziierte Degradation initiiert (Wiertz *et al.*, 1996a; Wiertz *et al.*, 1996b). Ähnlich geht der AIDS Virus HIV vor. Die Expression des HIV-1 kodierten Proteins Vpu induziert die Ubiquitinierung und anschließende Degradation des Oberflächenrezeptors CD4 (Margottin *et al.*, 1998). Eine Übersicht über weitere, mit der Qualitätskontrolle oder der ER-assoziierten Degradation in Verbindung gebrachte Krankheiten wird in den folgenden Artikeln gegeben: Kostova und Wolf (2002), Plemper und Wolf (1999), Rutishauser und Spiess (2002).

Proteasomaler Abbau „zurückgehaltener“ sekretorischer Proteine

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Proteine, die von der Qualitätskontrolle im ER als nicht richtig gefaltet erkannt werden, dem proteasomalen Abbau im Zytosol unterliegen. Deshalb müssen die missgefalteten Proteine zuerst vom ER zurück ins Zytosol transportiert werden. Diese sogenannte Retrotranslokation oder Dislokation erfolgt sehr wahrscheinlich durch den Sec61 Translokationskanal. Die im Zytosol erfolgende Markierung der Substrate mit Ubiquitin leitet den abschließenden Abbau im Proteasom ein. Dieser Abbauweg wird heute als ER-Degradation oder ER-assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet (Brodsky und McCracken, 1997).

Bis heute ist unklar, wie von der Qualitätskontrolle erfasste Proteine dem Abbau zugeführt werden. Man geht davon aus, dass Lektine wie Htm1, zumindest beim Abbau einiger glykosylierter Proteine, und die Protein Disulfid Isomerase Pdi1 eine Rolle spielen (Gillece *et al.*, 1999; Jakob *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2001). Ebenso könnte das Chaperon Kar2 und seine Partner Sec63, Scj1 und Jem1 beteiligt sein. Sie sind zur effizienten Degradation der löslichen ERAD Substrate CPY*, A1PiZ oder pro- α -Faktor notwendig (Brodsky *et al.*, 1999; Gillece *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2001; Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997). Fraglich ist jedoch, ob ihr Einfluss direkt auf den Transport der Substrate zum Retrotranslokationskanal zurückzuführen ist (Nishikawa *et al.*, 2001).

Genetische und biochemische Experimente schlagen das Sec61 Translokon als Retrotranslokationskanal vor (Bebök *et al.*, 1998; de Virgilio *et al.*, 1998; Gillece *et al.*, 2000; Petaja-Repo *et al.*, 2001; Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1998; Wiertz *et al.*, 1996b). Wie die Substratproteine in das Retrotranslokon gelangen ist noch nicht geklärt. Zumindest im Falle von Membranproteinen geht man jedoch von der Umkehrung der Membran Integration beim Import aus. Danach können Membransegmente von der Seite (lateral) ins Translokon diffundieren (Heinrich *et al.*, 2000). Beim Rücktransport löslicher Proteine vermutet man, dass Rezeptoren, analog dem co- und posttranslationalen Import (zusammengefasst in Johnson und van Waes, 1999), von der Qualitätskontrolle erfasste Proteine binden und das Sec61 Translokon durch Wechselwirkung zum Retrotranslokon umprogrammieren (zusammengefasst in Tsai *et al.*, 2002).

Wahrscheinlich noch während der Dislokation werden die Proteine in einer konzertierten Reaktion von Ubiquitin aktivierendem Enzym (Uba1, E1), Ubiquitin konjugierenden (Ubc's, E2s) und ligierenden Enzymen (E3s) polyubiquitiniert. Zur Ubiquitinierung des ER-Degradationssubstrats CPY* werden die Proteine Ubc1 (Friedländer *et al.*, 2000), Ubc6 (Hiller *et al.*, 1996), Ubc7 gemeinsam mit seinem Membrananker Cue1 (Biederer *et al.*, 1997; Hiller *et al.*, 1996) und dem Ubiquitin-Ligase-Komplex Hrd3-Der3/Hrd1 (Gardner *et al.*, 2000; Plemper *et al.*, 1999; Deak und Wolf, 2001) benötigt. Die Ubiquitin-Ligase Der3/Hrd1 ist ein Membranprotein (Bordallo *et al.*, 1998), das in seiner zytosolischen Domäne ein RING-H2 Motiv enthält und die E2-Enzyme Ubc1 und Ubc7 bindet (Bays *et al.*, 2001a; Deak und Wolf, 2001). Das Protein Der3/Hrd1 wird durch seinen Komplexpartner Hrd3 stabilisiert (Gardner *et al.*, 2000; Plemper *et al.*, 1999). Defekte in Komponenten des Ubiquitin Systems führen in Hefe unter anderem zur Stabilisierung der ERAD Substrate CPY* (Biederer *et al.*, 1997; Hiller *et al.*, 1996), Sec61-2 (Biederer *et al.*, 1996), Hmg2 (Hampton und Bhakta, 1997), Pdr5* (Plemper *et al.*, 1998), Vph1 (Hill und Cooper, 2000) und KNH_t (Vashist *et al.*, 2001). Kürzlich wurden zwei weitere, an ERAD beteiligte, Ubiquitin-Ligasen identifiziert. Die E3-Enzyme Doa10/Ssm4 und gp78 unterscheiden sich von Der3/Hrd1 in ihrer Substratspezifität (Fang *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 2001).

Die Markierung der Substrate durch Polyubiquitinierung scheint nicht nur für die proteasomale Erkennung (zusammengefasst in Pickart, 2000), sondern auch für die Translokation selbst notwendig zu sein. Wird die Polyubiquitinierung von ERAD Substraten unterbunden, akkumulieren sie im ER (Biederer *et al.*, 1996; Bordallo *et al.*, 1998; de Virgilio *et al.*, 1998; Jarosch *et al.*, 2002). Die räumlich anspruchsvolle Markierung durch Polyubiquitin-Ketten könnte ein Zurückgleiten des abzubauenen Substrats ins ER verhindern (Jarosch *et al.*, 2002; Riezman, 1997).

Kürzlich wurde gefunden, dass Mutationen in den Proteinen Npl4 und Ufd1 zur Stabilisierung von polyubiquitinierten Substraten an der ER-Membran führen. Beide Proteine bilden zusammen mit der AAA-ATPase Cdc48 einen Komplex. Man nimmt an, dass dieser

Komplex die treibende Kraft bei der Extraktion von Polypeptiden aus bzw. von der ER Membran ist (Bays *et al.*, 2001b; Braun *et al.*, 2002; Hitchcock *et al.*, 2001; Jarosch *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2000; Rabinovich *et al.*, 2002; Rape *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001).

Die polyubiquitinierten Substrate werden schließlich vom 26S Proteasom, einem zylindrischen Protease Komplex mit proteolytischer Aktivität, hydrolysiert. Das 26S Proteasom setzt sich aus einem 20S Kernkomplex und zwei regulatorischen 19S Subkomplexen zusammen. Der Kernkomplex besteht aus je zwei α - und β -Ringen mit je sieben unterschiedlichen Untereinheiten die in einer $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Staffelung angeordnet sind. Drei der sieben β -Untereinheiten besitzen peptidspaltende Aktivität: Spaltung nach basischen (tryptische Aktivität), nach sauren (PGPH Aktivität) und nach hydrophoben Aminosäuren (chymotryptische Aktivität). Die 19S regulatorischen Komplexe hingegen vermitteln die ATP abhängige Bindung, Entfaltung und Deubiquitinierung polyubiquitiniertes Substratproteine vor ihrem Abbau im 20S Kernkomplex (Glickman *et al.*, 2000; Heinemeyer, 2000; Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002).

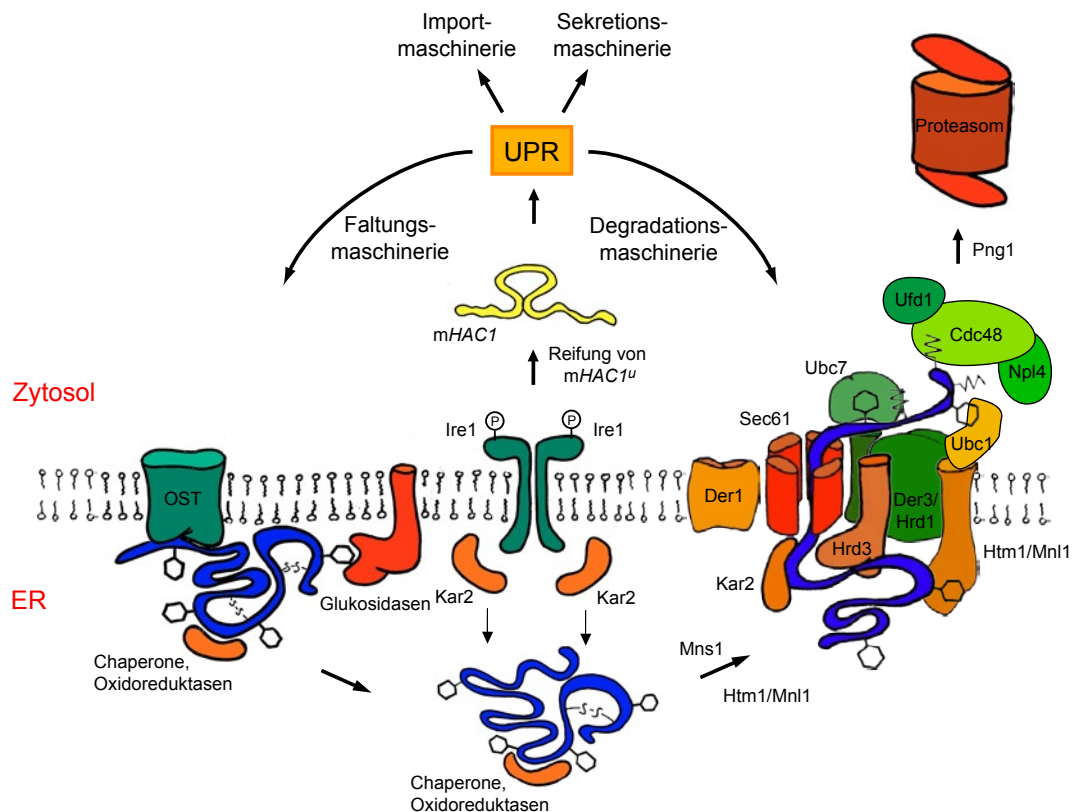


Abbildung 2: **Modell der ER-Qualitätskontrolle für glykosylierte lösliche Proteine in Hefe.** Die Anwesenheit ungefalteter Proteine löst die Aktivierung des Proteins Ire1 und die Translation von Hac1, durch Reifung von *HAC1^u* mRNA, aus. Der Transkriptionsfaktor Hac1 führt zur Expression von UPR regulierten Proteinen. Der Abbau ungefalteter Glykoproteine wird durch die Prozessierung von Mannosidase I und die Bindung an das Lektin Htm1 eingeleitet. Möglicherweise erfolgt dies auch im Zusammenspiel mit weiteren Chaperonen und Oxidoreduktasen des endoplasmatischen Retikulums. Die zum Abbau bestimmten Proteine werden zum Translokon gebracht. Hierbei könnten die Proteine Hrd3 und Der1 beteiligt sein. Während dem Rücktransport ins Zytosol wird das Substrat durch die Zusammenarbeit von den E2-Enzymen Ubc1 und Ubc7 mit dem E3-Komplex Der3/Hrd1-Hrd3 polyubiquitiniert. Die Polyubiquitinierung der Substrate und die Bindung an den Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex bewirken den Rücktransport. Nach der Deglykosylierung durch die zytosolische N-Glykanase Png1 erfolgt der Abbau durch das Proteasom.

Es hat sich gezeigt, dass CPY* in proteasomalen Mutanten teilweise im Zytosol in glykosylierter und ubiquitiniertes Form vorliegt (Hiller *et al.*, 1996; Jarosch *et al.*, 2002). Mit der Peptid:N-Glykanase Png1 konnte in *S. cerevisiae* ein Protein mit zytosolischer N-Glykanase Aktivität gefunden werden. Png1 bindet vorzugsweise entfaltete Glykoproteine, seine Abwesenheit führt zu einem verlangsamten Abbau von CPY* (Hirsch *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2000). Interessanterweise scheint Png1 über das Protein Rad23 direkt mit dem Proteasom assoziiert zu sein (Suzuki *et al.*, 2001).

Einige bakterielle Toxine wie das Cholera Toxin, das Shiga Toxin und das Pflanzentoxin Ricin scheinen Komponenten der ER-assoziierten Degradation bzw. des retrograden Transports auszunutzen, um vom ER ins Zytoplasma zu gelangen und dort ihre schädliche Wirkung zu entfalten (Schmitz *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2001; Wesche *et al.*, 1999).

UPR („unfolded protein response“)

Wird die ER-assoziierte Degradation blockiert, so akkumulieren ungefaltete Proteine im ER. Den dadurch entstehenden Stress versucht die Zelle durch erhöhte Expression von Chaperonen, Komponenten der ERAD Maschinerie und des sekretorischen Wegs, zu kompensieren. Diese zelluläre Reaktion wird allgemein als Antwort auf ungefaltete Proteine („unfolded protein response“; UPR) bezeichnet (Cox und Walter, 1996). In Hefe fungiert die transmembrane Proteinkinase/Endoribonuklease Ire1 als Sensor für ungefaltete Proteine. Man nimmt an, dass das Ire1 Protein durch Bindung von Kar2 in monomerer Form gehalten und dadurch inaktiviert wird. Kar2 hat jedoch eine höhere Bindungsaffinität für ungefaltete Proteine. Treten diese vermehrt auf, wird die Bindung an Ire1 gelöst und Ire1 kann dimerisieren. Anschließende Autophosphorylierung aktiviert den Ire1 Komplex und führt zusammen mit der zytosolischen tRNA-Ligase Rlg1 durch Spleißen zur Reifung von *HAC1^u* mRNA. Der dadurch gebildete Transkriptionsfaktor Hac1 bindet an UPRE Elemente im Promotor von über 300 Hefegenen und führt zu deren Transkription (Casagrande *et al.*, 2000; Friedländer *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000). In Säugern fällt die Antwort auf ungefaltete Proteine differenzierter aus. Es gibt dort mehrere parallele Signalwege, welche die Transkription von ER-Stressreduzierenden Proteinen vermitteln (zusammengefasst in Hampton, 2003).

Die Verknüpfung der Proteinqualitätskontrolle mit der UPR wird deutlich, wenn in Zellen beide Systeme gleichzeitig gestört werden. Zusätzlicher Stress, wie z. B. Hitzeschock, reduzierende oder glykosylierungshemmende Agenzien, führt zur konditionalen Letalität dieser Doppelmutanten, während Einzelmutationen in ERAD oder UPR kompensiert werden können (Casagrande *et al.*, 2000; Friedländer *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000).

Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Untersuchungen waren viele Komponenten der Proteinqualitätskontrolle in der Hefe *S. cerevisiae* bekannt, ihre genaue Funktion im Abbaumechanismus jedoch noch nicht aufgeklärt. Um weitere Erkenntnisse über die Mechanismen der endoplasmatischen Qualitätskontrolle zu erhalten, sollte deshalb mit Hilfe der von A. Finger isolierten Mutante *der7-1* das *DER7* Gen kloniert werden und die Funktion seines Genprodukts aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, warum eine Beteiligung der ERAD Komponente Der1 bisher nur am Abbau einiger löslicher Substrate gefunden wurde und welche Rolle das Protein dabei spielt. Zusätzlich sollte die funktionelle Ähnlichkeit von Der1-Familien Mitgliedern mit der des Der1 Proteins verglichen werden. Ferner war von zytosolischen Chaperonen nur eine Beteiligung an der ER-Degradation einiger Membranproteine bekannt. Daher sollte der Einfluss der zytosolischen Chaperone Hsp104, der Hsp90 Familie und mit Hsp90 assoziierter Kofaktoren auf die Degradation des löslichen Substrats CPY* untersucht werden.

Material und Methoden

Enzyme, Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig: ³⁵S-Methionin, ECL™-System, Nylonmembran
Boehringer-Mannheim, Mannheim: Nukleotide, Restriktionsendonukleasen, Ligasen, Polymerasen, Complete™ Inhibitor-Cocktail, Pefabloc SC
Difco, Detroit, USA: alle Bestandteile von Medien für Zellkulturen, DNA-Längenstandards
Invitrogen: SeeBlue™ Molekulargewichtsmarker
New England Biolabs, USA: Restriktionsendonukleasen Polymerasen
MWG-BIOTECH AG, Ebersberg: Oligonukleotide
Pall Corporation: Nitrozellulosemembran Biotrace™ NT 0,45 µm
Pharmacia Biotech, Freiburg: Protein A-Sepharose Cl-4B, Epoxy-aktivierte Sepharose 6B
Roche : Nukleotide, Restriktionsendonukleasen, Ligasen, Polymerasen, Complete™ Inhibitor-Cocktail, Pefabloc SC, Lumi-Light Western Blotting Detection
Schleicher und Schuell, Dassel: Nitrozellulose PH75, Blottingpapiere GB001, GB002, GB003
Seigagaku Kyogo, Tokyo, Japan: Zymolyase 100-T
Sigma, Deisenhofen: poly-L-Lysin, Tunicamycin

Alle weiteren Chemikalien wurden von den üblichen Herstellern in höchstmöglicher Reinheit bezogen.

Geräte

Amersham-Pharmacia: Detektionsscreens
Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifugen
Heraeus: Tischzentrifugen
Jasco, Tokyo: Spektrometer für Protein- und DNA-Konzentrationsmessungen, enzymatische Tests und Bestimmung der optischen Dichte von Zellkulturen
Kontron, München: Kühlzentrifugen
Molecular Probes: PhosphoImager
Phillips: Elektronenmikroskop
Zeiss, Oberkochen: Axioskop, Filtersets: 487914 für FITC, 487901 für DAPI und 487915 für Cy3

Antikörper

Kaninchen α CPY: (Finger *et al.*, 1993)
 Kaninchen α PrA: (Finger *et al.*, 1993)
 Kaninchen α Wbp1: M. Aebi
 Kaninchen α 1,6: (Franzussoff und Schekman, 1989)
 Kaninchen α 1,3: (Franzussoff und Schekman, 1989)
 Kaninchen α Der1: diese Arbeit, hergestellt von Eurogentech, Belgien
 Kaninchen α Der3: (Bordallo *et al.*, 1998)
 Kaninchen α Sec61: (Biederer *et al.*, 1996)
 Kaninchen α Kar2: (Rose *et al.*, 1989)
 Maus α HA: Babco (HA.11), USA
 Maus α CPY: Dianova, Hamburg
 Ziege α Maus IgG, HRPO konjugiert: Dianova, Hamburg
 Kaninchen α Maus, HRPO konjugiert: Sigma

Saccharomyces cerevisiae-Stämme

Name	Genotyp	Hintergrund	Herkunft
BY34394	<i>MATa</i> α Δ <i>trp5</i> :: <i>KAN^R</i> / Δ <i>trp5</i> :: <i>KAN^R</i> <i>his3</i> Δ 1/ <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0/ <i>MET15</i> <i>LYS2</i> / <i>lys2</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0	BY	EUROSCARF, Frankfurt
HFY406	<i>MATa</i> <i>spc3-4 ura3-52 leu2-3,112</i> <i>his3</i> - Δ 200 <i>trp1</i> - Δ 901 <i>suc2</i> - Δ 9 <i>lys2</i> -80	SEY6210	Fang <i>et al.</i> , 1997
W303-1B	<i>MATa</i> <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15</i> <i>leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	W303	Chiang und Schekman, 1991
W303-1C	<i>prc1-1</i>	W303-1B	Knop <i>et al.</i> , 1996a
W303-CD	<i>MATa</i> Δ <i>der1</i> :: <i>URA3</i>	W303-1C	Knop <i>et al.</i> , 1996a
W303-C Δ D	<i>MATa</i> Δ <i>der1</i> :: <i>HisG</i>	W303-1C	Knop <i>et al.</i> , 1996a
W303-CtD	<i>MATa</i> <i>DER1-HA</i>	W303-1C	Knop <i>et al.</i> , 1996a
YAF6	<i>MATa</i> <i>prc1-1 pra1</i> Δ SS <i>leu2-3,112</i>		Finger, 1994
YCT332	<i>MATa</i> Δ <i>cue1</i> :: <i>LEU2</i>	W303-1C	C. Taxis
YCT339	<i>MATa</i> α	W303-1C	C. Taxis
YFI11	<i>MATa</i> <i>der1-1</i>	YAF6	Finger, 1994
YFI115	<i>MATa</i> <i>der1-2</i>	YAF6	Finger, 1994
YFI277	<i>MATa</i> a <i>der7-1/der7-1</i>	YAF6	Finger, 1994

YG427	<i>MATα Δgls2::KAN^R his3-Δ200 ade2-101 ura3-52 lys2-801</i>	SS328	Jakob <i>et al.</i> , 1998b
YG744	<i>MATα Δgls1::KAN^R his3-Δ200 ade2-101 ura3-52 lys2-801</i>	SS328	C. Jakob
YRH20	<i>MATα Δhsc82::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH22	<i>MATα Δhsp82::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH23	<i>MATα Δhsp104::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH30	<i>MATα Δsti1::HIS3</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH32	<i>MATα Δsba1::URA3</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH54	<i>MATα der7-1</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH55	<i>MATα der7-1</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH59	<i>MATα Δdfm1::His3MX6</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH64	<i>MATα Δdfm1::His3MX6 Δire1::LEU2</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH65	<i>MATα Δire1::LEU2</i>	W303-1B	diese Arbeit
YRH66	<i>MATα Δire1::LEU2</i>	W303-1B	diese Arbeit
YRH68	<i>MATα Δire1::LEU2</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH71	<i>MATα der7-1 Δire1::LEU2</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH73	<i>MATα His3MX6::P_{GALI-3HA-DER1}</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH78	<i>MATα Δder1::URA3 Δire1::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH79	<i>MATα Δder1::URA3 Δire1::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH80	<i>MATα der1-2 trp1::P_{MET25-GFP}::TRP1</i>	W303-1B	diese Arbeit
YRH86	<i>MATα Δder1::URA3 Δdfm1::His3MX6</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH90	<i>MATα Δire1::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH105	<i>MATα der1-2 Δire1::KAN^R trp1::P_{MET25-GFP}::TRP1</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH106	<i>MATα der1-2 Δire1::KAN^R trp1::P_{MET25-GFP}::TRP1</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH107	<i>MATα/α der1-2/der1-2 Δire1::KAN^R/ Δire1::KAN^R trp1::P_{MET25-GFP}::TRP1/ trp1::P_{MET25-GFP}::TRP1</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH110	<i>MATα/α Δder1::URA3/Δder1::URA3 Δire1::KAN^R/Δire1::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH118	<i>MATα/α der7-1/Δgls1::KAN^R leu2-3,112/ LEU2 prc1-1/PRC1 trp1-1/TRP1 LYS2/ lys2-801</i>	W303-1Cx YG744	diese Arbeit

YRH119	<i>MATa/α der7-1/Δgls2::KAN^R leu2-3,112/ LEU2 prc1-1/PRC1 trp1-1/TRP1 LYS2/ lys2-801</i>	W303-1Cx YG427	diese Arbeit
YRH126	<i>MATα DER1-13Myc::His3MX6</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH132	<i>MATa DER1-HA</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH143	<i>MATα Δder1::HisG DFM1-3HA::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH145	<i>MATα DER1-HA DFM1-3HA::KAN^R</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH153	<i>MATα der1-2</i>	W303-1C	diese Arbeit
YRH156	<i>MATα Δtrp5::KAN^R</i>	BY	diese Arbeit
YRP86	<i>MATα sec61-2</i>	W303-1C	Plemper <i>et al.</i> , 1997
YRP134	<i>MATa/α</i>	W303-1C	R. Plemper

Escherichia coli-Stämme

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5α verwendet.

DH5α	F'/endA1 hsdR17(rk-mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 \cap (lacZYA-argF)U169 (\in 80lacZ \cap M15)	Hanahan, 1983
------	--	---------------

Plasmide

Name	Genotyp	Herkunft
YEp24	2μ URA3 Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^r)	Botstein <i>et al.</i> , 1979
pRS304	integrativer URA3 Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^r)	Sikorski und Hieter, 1989
pRS315	CEN LEU2 Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^r)	Sikorski und Hieter, 1989
pRS424	2μ HIS3 Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^r)	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS425	2μ URA3 Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp ^r)	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pFA6a-kanMX6	<i>E. coli</i> Plasmid mit KAN ^R	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-His3MX6	<i>E. coli</i> Plasmid mit HIS5 ⁺	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-3HA- kanMX6	<i>E. coli</i> Plasmid zur 3xHA und KAN ^R	Longtine <i>et al.</i> , 1998

pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6	<i>E. coli</i> Plasmid zur GFP ^{S65T} Markierung und <i>KAN^R</i>	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA	<i>E. coli</i> Plasmid zur 3xHA Markierung und <i>HIS5⁺</i>	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pBPH1-CWH41	<i>P_{ADHI-CWH41} CEN URA3</i>	Simons <i>et al.</i> , 1998
pFG112	Plasmid mit <i>SUC2A</i> Fragment	Gilstring und Ljungdahl, 2000
pHIT105	pRS315 Δ <i>der1::URA3</i>	diese Arbeit
pHIT106	pRS315 <i>DER1-13Myc::His3MX6</i>	diese Arbeit
pHIT107	pRS315 <i>His3MX6::P_{GALI-3HA-DER1}</i>	diese Arbeit
pHIT109	pRS315 <i>3HA-DER1</i>	diese Arbeit
pHIT110	pRS304 <i>P_{MET25-GFP}</i>	diese Arbeit
pHIT118	pRS315 <i>DER1-IRS</i>	diese Arbeit
pHIT124	pRS424 <i>DER1^{D45}::SUC2A</i> (Loop1)	diese Arbeit
pHIT125	pRS424 <i>DER1^{E85}::SUC2A</i> (Loop2)	diese Arbeit
pHIT126	pRS424 <i>DER1^{Y128}::SUC2A</i> (Loop3)	diese Arbeit
pHIT134	pRS425 <i>P_{DER1-R151.6-T_{DER1}}</i>	diese Arbeit
pHIT135	pRS425 <i>DER1^{209NAS}::KAN^R</i>	diese Arbeit
pJU341	pRS405 Δ <i>ire1::LEU2</i> Disruptionsplasmid	Friedländer <i>et al.</i> , 2000
pGFP-C-FUS	<i>P_{MET25::GFP CEN URA3}</i>	Niedenthal <i>et al.</i> , 1996
pMA1	pRS316 <i>P_{TDH3::prc1-1::pdr5₄₃₃₂₋₄₅₃₂-GFP^{S65T}::His3MX6}</i>	M. Lokhova, (siehe Taxis, 2002)
pRS315 <i>DER1</i>	pRS315 <i>DER1</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996a
pRS315 <i>der1-1</i>	pRS315 <i>der1-1</i>	diese Arbeit
pRS315 <i>der1-2</i>	pRS315 <i>der1-2</i>	diese Arbeit
pRS315 <i>DER1-HA</i>	pRS315 <i>DER1-HA</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996a
pRS425 <i>DER1</i>	pRS425 <i>DER1</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996a
pRS425 <i>DER1-HA</i>	pRS425 <i>DER1-HA</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996a
pUG6	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>KAN^R</i>	Güldener <i>et al.</i> , 1996

Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3' Richtung angegeben. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen zur DNAMatrize homologe Sequenzen. **Fettgedruckte** Sequenzen markieren im Oligonukleotid DER1-IRS rev das IRS-Epitop, in DER1 c-glyc die Glykosylierungs-Konsensussequenz Asp-Ala-Ser und die Restriktionsschnittstelle BglII in L1/2/3-BglII.

Name	Basenabfolge 5' -> 3'
F4 3HA-DER1	ATTCGTCACCAACAGAAGAAAAGCTAAAGCCCAAGCAATAT GTTAATTAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
R3 3HA-DER1	TGACCAAAGGAATGTCGCCTAAGAGATTCAGTATTACAGCAT CGCACTGAGCAGCGTAATCTG
der1 prom	GAATTACAGCAGAGATTCGTCA
der1 term	CAACGTTTCATTTATCCTTGG
DER1-IRS rev	TGTTATTGGTTTTTGGTAAATAAAAACGGCCTTTCCTTTATTA GAACGAATATACCGCGGTGTTTCAGTGTTGCGG
DER1 c-glyc	TCTCCGTACGACTGGTTCGCAACACTGAAA ACGCTAGCAC ACCCTAAGGCGCGCCACTTCTAAA
der1gfp->	TAAATCTCCGTACGACTGGTTCGCAACACTGAAACACCCTC GTACGCTGCAGGTCGAC
<-der1gfpk	TGTTATTGGTTTTTGGTAAATAAAAACGGCCTTTCCTTTATCGA TGAATTCGAGCTCG
hsc82up	ACGCTACAGAACCAATAGAAAAATAGAATCATTCTGAAATCA GCTGAAGCTTCGTACGC
hsc82down	AATTTATATAATATATAAAACATGAAGGCGAAAAAAGAGAGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG
hsp82up	AGAGTCCTATAAACAAAAGCACAAACAAACACGCAAAGATC AGCTGAAGCTTCGTACGC
hsp82down	ATGTTTTGTTTATAACCTATTCAAGGCCATGATGTTCTACGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG
hsp104 up	AAAGAAATCAACTACACGTACCATAAAATATACAGAATACAG CTGAAGCTTCGTACGC
hsp104 down	ATTCTTGTTTCGAAAGTTTTTAAAAATCACACTATATTAAAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG
ire1 fwd	CTTTAAAGATTATCCATCG
ire1 rev	TTCTGCTATATCTTCAGG

ire1-P1	<u>AAACAGCATATCTGAGGAATTAATATTTTAGCACTTTGAAAAC</u> <u>AGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
ire1-P2	TAATGCAATAATCAACCAAGAAGAAGCAGAGGGGCATGAAC <u>ATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
L1-BglII	GTCCCTTTTTGAATACTAAAGATCTATCATAACTGTACACTAC C
L2-BglII	CAGATTGAATGAGTTAGATCTTTCCAAAGTTGATAAG
L3-BglII	CCGTTCTTTTCAGTTCGTAAGATCTGTACACGAGATTCTCAT GC
MATalpha 1	TACTTCGAAGCCTGCTTTCA
MATa 1	TCATCAATATCACCCCAAGC
MAT rev	GTGGAGGCACCCAAGAAG
R151.6 fwd2	AACAGAAGAAAAGCTAAAGCCCAAGCAATATGAATGGAGTA GTTGCTGC
R151.6 rev	TTTGGTAAATAAAAACGGCCTTTCCTTTAATCATGTTGTTCTT GTTCCG
YDR411c-F2	CCGCATTTCCAAGTCAAATCAAAAACACTATTTTCGAGGAAATA <u>CGGATCCCCGGGTAAATTA</u>
YDR411c-R1	TATATAATGAATGGCAAAGTACATAGAAATAGATAAAAGTTGG <u>AATTCGAGCTCGTTTAAAC</u>
YDR411c_F22	CGCGGCCAACGAGTAGGACAAACAAACAGCCCCCTCCGACTC <u>ACAACGGATCCCCGGGTAAATTA</u>
YEp13 BamHI fwd	CCGTTCTCGGAGCACTGTCC
YEp13 BamHI rev	GGTGATGTCGGCGATATAG

Wachstum und Konstruktion von Hefestämmen

Für die Aufzucht von Hefe- und *E. coli* Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Ausubel, 1992; Guthrie und Fink, 1991; Sambrook *et al.*, 1989). Inositolfreies Medium wurde wie in Guthrie und Fink (1991) beschrieben hergestellt. Hefestämme wurden nach der Lithiumacetat-Methode transformiert (Ito *et al.*, 1983). Der Paarungstyp wurde entweder durch Kreuzen mit den Stämmen YR312 und YR320 und anschließender Wachstumsanalyse auf MV Medium (2 % Glukose) bei RT oder durch Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden MATalpha 1, MATa 1 und MAT rev (Fragmentgröße *MATa*: 0,9 kb, *MATα* 1 kb) ermittelt.

Die Disruption der Gene *HSC82*, *HSP82* und *HSP104* erfolgte nach der Methode von Güldener (Güldener *et al.*, 1996). Vom Plasmid pUG6 wurde mit den Oligonukleotid Paaren *hsc82up/hsc82down*, *hsp82up/hsp82down* und *hsp104up/hsp104down* 1,6 kb große, *KAN^R*

enthaltende, DNA-Fragmente amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in den Stamm YRP134 transformiert und nach Geneticin Resistenz (G418; 200 mg/l YPD) selektioniert. Anschließend wurden die Stämme sporuliert und einer Tetradendisektion unterworfen. Die korrekte Integration wurde mit Southernblot Analyse kontrolliert. Als Ergebnis wurden die Stämme YRH20, YRH22 und YRH23 erhalten.

Die Stämme YRH30 ($\Delta sti1::HIS3$) und YRH32 ($\Delta sba1::URA3$) wurden durch Kreuzung von W303-1C und mit ACY77 bzw. YF233 (Fang *et al.*, 1998) erzeugt. Die nach der Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen wurden auf Histidin- bzw. Uracilprototrophie sowie CPY Aktivität untersucht.

Zur Disruption des *IRE1* Gens mit *LEU2* wurde das Plasmid pJU341 (Friedländer *et al.*, 2000) mit HindIII linearisiert und in die Stämme W303-1B sowie W303-1C transformiert. Leucin prototrophe Stämme wurden auf Tunicamycin Sensitivität (0,2 $\mu\text{g/ml}$) und auf inositolabhängiges Wachstum geprüft (zusammengefasst in Greenberg und Lopes, 1996). Korrekte Integration des *LEU2* Gens wurde durch anschließende Southernblot Analyse bestätigt. Die erhaltenen Stämme heißen YRH65, YRH66 und YRH68. Die Deletion von *IRE1* mit dem Geneticinresistenzgen *KAN^R* wurde nach Güldener *et al.* (1996) durchgeführt. Dazu wurde von Plasmid pUG6 mit den Oligonukleotiden ire1-P1 und ire1-P2 ein 1,6 kb DNA Stück amplifiziert und dieses anschließend in den heterozygot diploiden W303 $\Delta der1/DER1$ *prc1-1/PRC1* transformiert. Geneticin resistente (G418; 200 mg/l YPD) Transformanten wurden sporuliert und einer Tetradendisektion unterworfen. Die erhaltenen Sporen wurden auf Uracilprototrophie, Geneticin Resistenz, Wachstum auf inositolfreiem Medium und CPY Aktivität getestet. Die daraus erhaltene Stämme waren YRH78 (W303-1C *MATa* $\Delta der1::URA3$ $\Delta ire1::KAN^R$), YRH79 (W303-1C *MATa* $\Delta der1::URA3$ $\Delta ire1::KAN^R$) und YRH90 (W303-1C *MATa* $\Delta ire1::KAN^R$). Die Paarung der konditional letalen Stämme YRH78 und YRH79 resultierte im homozygot diploiden Stamm YRH110.

Um das *der7-1* Allel im zu W303-1C isogene Stammhintergrund zu erhalten, wurde der Stamm YFI277 (Finger, 1994) viermal gegen den Stamm W303-1C rückgekreuzt. Da YFI277 homozygot diploid bezüglich des Paarungstyps war, wurde zur ersten Rückkreuzung ein homozygot diploider W303-1C Stamm verwendet (YCT339). Die Unterscheidung von Wildtyp und *der7-1* erfolgte durch Vergleich des Molekulargewichts von CPY* im Western Blot. Nach der vierten Paarung wurden durch Tetradendisektion die Stämme YRH54 und YRH55 erhalten.

Die heterozygot diploiden Stämme YRH118 (*der7-1*/ $\Delta cwh41$) und YRH119 (*der7-1*/ $\Delta rot2$) wurden durch Kreuzung der Stämme YRH54 und YG744 ($\Delta gls1/cwh41$) (C. Jakob) bzw. YG427 ($\Delta gls2/rot2$) (Jakob *et al.*, 1998b) erzeugt.

Die Doppelmutante *der7-1* $\Delta cwh41$ (YRH71) wurde aus der Kreuzung von YRH66 und YRH54 und anschließender Tetradendisektion erhalten.

Der zur meiotischen Kartierung von *der7-1* verwendete heterozygot diploide *der7-1/DER7 TRP5/Δtrp5* Stamm wurde durch Paarung von YRH156 und YRH54 gewonnen. YRH156 wurde zuvor durch Sporulation von BY34394 (*Δtrp5::KAN^R*) und nachfolgender Tetradendisektion erhalten.

N- und C-terminale Epitopmarkierung von Der1 wurde nach Longtine *et al.* (1998) vorgenommen. Zur Markierung des N-Terminus mit einem Galaktose induzierbaren 3-fach HA Epitop wurde mit den Oligonukleotiden F4 3HA-DER1 und R3 3HA-DER1 von Plasmid pFA6a-His3MX6-PGAL1-3HA ein 2 kb Fragment amplifiziert. Die C-terminalen Markierung erfolgte mit einem 2,1 kb DNA-Stück, das durch PCR mit den Oligonukleotiden *der1gfp->* und *<-der1gfpk* von Plasmid pFA6a-13Myc-His3MX6 erhalten wurde. Nach der anschließenden Transformation der DNA-Fragmente in YRP134, wurde die korrekte Integration von Histidin prototrophen Kandidaten durch Kolonie-PCR und Detektion des markierten Proteins im Western Blot überprüft. Aus den jeweils nachfolgenden Tetradendisektionen wurden die Stämme YRH73 und YRH126 isoliert.

Das *der1-2* Allel wurde durch spontane Genkonversion in den W303-1C Stammhintergrund eingebracht. Dazu wurde ein pRS315*der1-2* Plasmid tragender W303-CD Stamm über Nacht in YPD kultiviert, die Zellen geerntet und dann 1 OD₆₀₀ Zellen auf 5-FOA haltigen Platten ausplattiert. Der Einbau des *der1-2* Allels in 5-FOA resistenten Transformanten wurde durch Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden *der1prom* und *der1term* überprüft (*Δder1*: 1,5 kb; *der1-2*: 0,8 kb). Es wurde der Stamm YRH153 (W303-1C *der1-2*) erhalten. Anschließend wurde in diesen Stamm, mittels dem mit BstXI linearisierten Plasmid pHIT110, ein durch Methionin induzierbares GFP („green fluorescence protein“) eingeführt. Tryptophan prototrophe Transformanten wurden im Fluoreszenz-Mikroskop auf GFP Induktion in CM -Methionin Medium (3 Stunden) untersucht. Durch anschließende Kreuzung mit W303-BD und Tetradendisektion wurde der Stamm YRH80 erzeugt.

Zur Erzeugung des diploiden Stamms YRH107 wurden zunächst die Stämme YRH78 mit YRH80 gekreuzt. Aus der anschließenden Tetradendisektion wurden die Stämme YRH105 und YRH106 erhalten. Da die haploiden *der1-2 Δire1* Doppelmutanten zur Bildung von Suppressor Kolonien neigten, wurden sie gepaart (YRH107).

Das Gen *DFM1/YDR411c* wurde durch Integration des *His3MX6*-Moduls zerstört (Longtine *et al.*, 1998). Dazu wurde vom Plasmid pFA6a-His3MX6 mit den Oligonukleotiden YDR411c-F2 und YDR411c-R1 ein 1,4 kb DNA Stück amplifiziert und anschließend in YRP134 transformiert. Histidin prototrophe Kandidaten wurden anschließend sporuliert und einer Tetradendisektion unterworfen. Die korrekte Disruption von *DFM1/YDR411c* in YRH59 wurde durch Southernblot Analyse bestätigt.

Die Doppelmutanten YRH64 (*Δdfm1 Δire1*) und YRH86 (*Δdfm1 Δder1*), sowie der Stamm W303-1B *Δdfm1::His3MX6*, wurden aus der Kreuzung von YRH59 mit YRH66 bzw. W303-CD

und nachfolgender Tetradendisektion gewonnen. Die Paarung von W303-1B $\Delta dfm1$ und YRP86 ergab den heterozygot diploiden Stamm W303 *sec61-2/SEC61 $\Delta dfm1/DFM1 prc1-1/PRC1$* .

Zur chromosomalen Expression von Dfm1-3HA wurde *DFM1* nach Longtine *et al.* (1998) markiert. Dazu wurde vom Plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 mit den Oligonukleotiden YDR411c_F22 und YDR411c-R1 ein 1,9 kb DNA Fragment amplifiziert und in einen diploiden Hefe-Stamm, erzeugt durch Paarung von YRH132 (*DER1-HA*) mit W303- Δ CD, transformiert. Nach der Tetradendisektion wurde in Geneticin resistenten Transformanten $\Delta der1$ (0,3 kb) von DER1-HA (0,8 kb) durch Kolonie-PCR (Oligonukleotide *der1prom* und *der1term*) unterschieden. Zusätzlich wurde in den Stämmen YRH143 und YRH145 der Einbau des markierten Proteins durch Detektion und die Der1 Aktivität durch Vergleich der CPY* Gleichgewichtsmenge im Western Blot kontrolliert.

Molekularbiologische Methoden und Plasmidkonstruktion

Für die Konstruktion von Plasmiden wurden Standardtechniken verwendet (Ausubel, 1992; Sambrook *et al.*, 1989). Enzyme wurden nach den Angaben der Hersteller eingesetzt, *E. coli*-Stämme mit Elektroporation transformiert. Mittels PCR vervielfältigte DNA-Fragmente wurden durch kommerzielle Firmen (Biolux, Stuttgart-Vaihingen; GATC, Konstanz) sequenziert.

Um das Reportergen *SUC2A* in *DER1* einzufügen, wurde zunächst eine BglII Schnittstelle an der jeweiligen Position insertiert. Dazu wurde PCR Fragmente mit den Oligonukleotiden *der1prom* und L1-BglII, L2-BglII und L3-BglII (190bp, 300 bp und 440 bp) von Plasmid pRS315*DER1* amplifiziert. Diese wurden als „Megaprimer“ in einer zweiten PCR mit *der1prom*, *der1term* und DNA-Matrize pRS315*DER1* eingesetzt. Die erhaltenen 0,75 kb DNA-Stücke wurden anschließend mit den isolierten DNA Fragmenten pRS315*DER1* BspEI-BsmI (L1) und Eco47III-BsmI (L2 + L3) durch homologe Rekombination in W303-CD zusammengesetzt. Nach der Plasmidisolation aus *E. coli* wurden daraus die Plasmide pHIT111, pHIT112, pHIT113 erhalten. Die Ligation der mit BglII linearisierten Plasmide pHIT111-113 mit dem 150 bp großen BamHI-*SUC2A*-Fragment aus pFG112 (Gilstring und Ljungdahl, 2000) ergab die Plasmide pHIT114, pHIT115 und pHIT116. Homologe Rekombination des mit SpeI-ClaI geöffneten Vektors pRS424 und der 4,4 kb Fragmente aus SapI-AgeI geschnittenen Plasmiden pHIT114-116 in W303-CD resultierte in den Plasmiden pHIT124, pHIT125 und pHIT126.

Das Plasmid pHIT105 ($\Delta der1::URA3$) wurde durch „gap repair“ in Hefe und anschließend „plasmid rescue“ aus *E. coli* isoliert. Dazu wurde das Plasmid pRS315*DER1* mit BssHII-MluNI aufgeschnitten und in W303-CD transformiert. In gleicher Weise wurden die Allele *der1-1*, *der1-2* und *P_{GALI}-3HA-*DER1** nach der Transformation der BssHII-MluNI geschnittenen Plasmide pHIT105 bzw. pRS315*DER1* aus den Stämmen YFI11, YFI115 (Finger, 1994) und YRH73 erhalten. Die so erzeugte Plasmide waren pRS315*der1-1*, pRS315*der1-2* und pHIT107. Die Sequenzierung der *der1* Allele erfolgte mit den Oligonukleotiden *der1prom* und *der1term*.

Aus Plasmid pHIT107 wurde durch Restriktionsverdau mit PacI der *GALI*-Promotor und der *HIS3MX6* Selektionsmarker entfernt. Die anschließende Religation des so erhaltenen 8,4 kb großen PacI-Fragments ergab das Plasmid pHIT109.

Zur C-terminalen Markierung von Der1 mit dem IRS Epitop wurde ein 0,7 kb großes DNA Fragment von pRS315*DER1* mit den Oligonukleotiden der1prom und DER1-IRS rev PCR amplifiziert. Zusammen mit einem 8,3 kb PacI-PmeI Fragment aus pHIT106 wurde es in W303-CD transformiert. Aus einem Leucin prototrophen Kandidaten wurde das Plasmid pHIT118 isoliert.

Das für Der1-G kodierende Plasmid pHIT135 wurde durch homologe Rekombination von AatII linearisiertem pRS425*DER1-HA* (Knop *et al.*, 1996a) und einem 1,7 kb DNA-Fragment, erhalten aus der PCR Amplifizierung von Plasmid pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Longtine *et al.*, 1998) mit den Oligonukleotiden DER1 c-glyc und <-der1gfpk, in W303-CD erzeugt.

Das P_{MET25} -GFP Integrationsplasmid pHIT110 wurde durch Ligation eines 1,4 kB großen SacI-KpnI Fragmentes aus pGFP-C-FUS (Niedenthal *et al.*, 1996) und dem mit den gleichen Enzymen geöffneten pRS304 erhalten.

Zur heterologen Expression von R151.6 in Hefe, wurde mit den Oligonukleotiden R151.6 fwd2 und R151.6 rev von Plasmid R151.6pCRII C-2 (Hough *et al.*, 1999) ein 0,8 kb großes, *R151.6* cDNA enthaltendes DNA Stück amplifiziert. Durch homologe Rekombination in W303-CD mit einem 7,75 kb BspEI-BsiWI Fragment aus pRS315*DER1* wurde das Plasmid pHIT119 erzeugt. pHIT119 exprimiert R151.6 unter der Kontrolle des *DER1* Promoters. Zur Überexpression von R151.6 (pHIT134) wurde ein 2,3 kb große HindIII Fragment aus pHIT119 durch homologe Rekombination in W303-CD mit dem 7 kb AatII-StuI DNA-Stück aus pRS425*DER1-HA* umgesetzt.

Biochemische Methoden

Antikörperproduktion + Affinitätsreinigung

Die Auswahl der zur Der1 Antikörperproduktion verwendeter Peptide erfolgte aufgrund ihrer Antigenizität und Hydrophilie (siehe Abbildung 12). Die Peptide NHLSTLENSFNLRKFC (EP 010289) und ELKKNGNQMNVRRC (EP 010290) wurden von Eurogentech (Belgien) synthetisiert und über Cystein an stark antigenes KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt. Die Immunisierung von zwei Kaninchen (SA246 und SA247) erfolgte nach dem Standardprotokoll von Eurogentech. Die erhaltenen Antikörperchargen, Testserum nach der dritten und finales Serum nach der vierten Injektion, wurden im Western Blot getestet. Während das Testserum von Kaninchen SA247 (1:500) ein Der1 spezifisches Signal im Westen ergab, zeigte das finale Serum Kreuzreaktivität und wurde deshalb affinitätsgereinigt. Mit dem Serum des zweiten Kaninchens (SA246) konnte kein Der1 spezifisches Signal erhalten werden.

Zur Affinitätsreinigung des finalen Serums (SA247) wurden die Peptide EP 010289 und EP 010290 über Cystein an 300 mg Epoxy-aktivierte Sepharose 6B Säule (Pharmacia Biotech) gebunden. Die Säule wurde dazu in 3 ml H₂O gequollen und anschließend mit 60 ml H₂O in einer Glasfritte gespült (1 Stunde). Zur Kopplung wurde die Säule im 15 ml Falcon-Röhrchen zweimal mit je 2 ml Kopplungspuffer (CB: 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,6 % v/v DMF, pH 10) gewaschen (500 xg/1 min). Die aufgelösten Peptide, 4 mg EP 010289 in 150 µl H₂O + 4 µl DMF und 3 mg EP 010290 in 100 µl H₂O, wurden in 1,6 ml CB aufgenommen und über Nacht bei RT an die äquilibrierte Säule gebunden (rotieren). Fünfmaliges Waschen mit je 1-2 ml CB-Puffer entfernte nicht gebundene Peptide (500 xg/1 min). Der Peptidgehalt in den Waschlösungen wurde durch eine Proteinbestimmung nach Bradford (100 µl Waschlösung + 1 ml Bradfordlösung, $\lambda=595$ nm) ermittelt. Anschließendes äquilibrieren der Säule (dreimal waschen, je 2 ml) und Inkubation mit 2 ml 1 M Ethanolamin (pH 8,0) über Nacht, sättigte überschüssige Bindungsstellen ab. Fünf Waschzyklen mit je 2 ml 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M Natriumchlorid (pH 4,0) gefolgt von 2 ml 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M Natriumchlorid (pH 8,0) entfernten das Ethanolamin. Die Säule wurde dann in eine Econo-Column (BioRad, #737-1007) überführt, mit 10 ml PBS (pH 7,5) äquilibriert und durch Zugabe von Natriumazid (Endkonzentration 10 mM) konserviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

Zur Affinitätsreinigung des Serums wurde die konservierte Säule auf RT erwärmt, mit 70 ml PBS gespült und in 2 ml PBS gelagert. 6 ml finales Serum (SA247) wurde durch Zentrifugation (4 min/20000 xg) von Verunreinigungen getrennt und auf die Säule aufgetropft. Zur effektiveren Bindung wurde der Durchlauf dreimal auf die Säule gegeben. Nach der Abtrennung des Durchlaufs wurde die Säule mit 30 ml PBS gewaschen und gelegentlich der Proteingehalt der Waschlösungen bestimmt (Bradford-Test). Der gebundene Antikörper wurde schließlich mit 15 ml 0,1 M Glycin (pH 2,8) eluiert und in Aliquots zu 1 ml aufgefangen. Um eine Beschädigung des Antikörpers zu vermeiden wurden die Aliquots so schnell wie möglich

mit 80 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Der Proteingehalt der Antikörper-Fractionen wurde durch Bradford-Analyse (10 µl bzw. 50 µl Antikörperlösung + 1 ml Bradford) ermittelt. Fractionen mit ähnlichem Proteingehalt wurden vereinigt und anschließend im Western Blot immunologisch detektiert (1:500). Der aufgereinigte Antikörper erkannte das Protein Der1-HA nahezu kreuzreaktionsfrei.

Die Regeneration der Säule erfolgte durch drei Waschzyklen mit je 2 ml 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M Natriumchlorid (pH 4,0) gefolgt von 2 ml 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M Natriumchlorid (pH 8,0). Danach wurde einmal mit 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M Natriumchlorid (pH 8,0) gewaschen, bevor die Säule mit 30 ml PBS gespült wurde. Gelagert wurde die Säule in 2 ml PBS mit 30 mM Natriumazid.

Immunodetektion von Proteinen

Für den immunologischen Proteinnachweis wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) nach ihrer Größe aufgetrennt und durch Elektronentransfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen übertragen (Ausubel, 1992). Die Detektion des antigenen Materials erfolgte nach der Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern nach Vorschrift der Herstellers (ECL, Amersham; Lumi-Light Western Blotting, Roche). Der Zellaufschluss erfolgte für lösliche Proteine mit alkalische Lyse (Yaffe und Schatz, 1984), für Membranproteine im 15 ml Corex Glasgefäß mit Glasperlen (Egner *et al.*, 1993). Für die Membranextraktion mit anschließendem Protease-Verdau wurden die Zellen durch spheroblastieren (Egner *et al.*, 1995) und lysieren mit einem Homogenisator aufgeschlossen.

Cycloheximid Chase Analyse

Zur Verfolgung des Abbaus von Proteinen, wurden logarithmisch wachsenden Zellen mit Cycloheximid (200µg/ml) versetzt und dadurch die Proteinbiosynthese gestoppt. Je Zeitpunkt wurde 2 OD₆₀₀ Zellsuspension entnommen und durch alkalische Lyse aufgeschlossen (Deak, 2001). Die Detektion antigenen Materials erfolgte im Immunoblot.

„Pulse Chase“ Analyse

Der Abbau von radioaktiv markierten Proteinen wurde wie in Taxis (2002) beschrieben durchgeführt. Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 in herangezogen, 5-10 OD₆₀₀ Hefezellen entnommen und in 1 ml „labeling“ Medium (SC-Medium, ohne Methionin, Cystein, Ammoniumsulfat und mit 0,1% Glucose) für 50 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Durch Zugabe von 250 µCi ³⁵S-Methionin wurden die Zellen für 20 min (CPY* und CTG* Abbau) pulsmarkiert. Durch Zugabe von 1 ml „chase“ Medium (6 mg/ml Methionin und 2 mg/ml BSA in „labeling“ Medium) wurde der Einbau von ³⁵S-Methionin gestoppt. Danach wurde sofort die erste Probe entnommen, alle weiteren Proben wurden zu den in den Experimenten angegebenen Zeiten abgezogen. Die Zellyse erfolgte mit Glasperlen in

100 µl BB1 Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 6 M Harnstoff; 1 % SDS w/v, 1 mM EDTA). Sie wurden dazu fünfmal abwechselnd 1 min auf 95°C erhitzt und anschließend 1 min mit einer Rüttelplattform gevortext. Der Lysemix wurde anschließend mit 5 µl Inhibitor Mix (Complete, Boehringer) in 1 ml IP Puffer (50 mM Tris/HCl pH7,5; 1,25 % v/v Triton X-100; 6 mM EDTA; 190 mM Natriumchlorid) versetzt und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min bei 14000 xg). Zur Immunopräzipitation wurden 5 µl Antikörper zugegeben und 1 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Mit 80 µl Protein A Sepharose Suspension wurde eine weitere Stunde im Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Die Sepharose wurde dreimal mit IP Puffer gewaschen und anschließend 60 µl Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % w/v SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % w/v Bromphenolblau; 1,5 % w/v Dithiothreitol) aufgenommen. Proteinkomplexe wurden durch Erhitzen (5 min/95 °C) aufgelöst. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie, zur Quantifizierung wurde ein Detektionsscreen (Amersham) und ein PhosphorImager (Molecular Probes) verwendet.

CPY Aktivitätstest

Der CPY-Aktivitätstest wurde wie in Guthrie und Fink (1991) beschrieben durchgeführt.

Indirekte Immunofluoreszenz

Eine 2,5 ml Übernachtskultur logarithmisch wachsender Zellen in steril filtriertem SC-Medium wurden mit 500 xg/2 min geerntet und in 1 ml eigenem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 125 µl 1 M Kaliumphosphat pH 6,5 und 140 µl 37 %igem Formaldehyd über Nacht fixiert. Nach dem Sammeln der Zellen (500 xg/2 min) und dreimaligem Waschen mit 500 µl Spheroblasten-Puffer (SP: 1,2 M Sorbitol, 0,1 M Kaliumphosphat, pH 6,5) wurden sie in 1 ml SPβ (SP, 20 mM β-Mercaptoethanol, 1,5 mg/ml Zymolyase T100) aufgenommen. Die Spheroblastierung erfolgte 45 min bei 30 °C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (500 xg/2 min), zweimal mit 500 µl SP gewaschen und in 1 ml SP aufgenommen. In der Zwischenzeit wurde ein Objektträger mit 5-10 µl Poly-L-Lysin behandelt, mit 10 µl H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach der Zugabe von 20-30 µl Zellen wurde 30 min inkubiert. Nicht haftende Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt, der Rest mit 20 µl PBT (PBS, 1 % BSA, 0,05 % NP40, 0,1 % Natriumazid) bedeckt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper (αHA (Babco)/1:200, αSec61/1:200) in PBT. Nach fünfmaligem Waschen mit 20 µl PBT wurde der Sekundärantikörper zugegeben (goat anti rabbit FITC/1:350, goat anti mouse Cy3/1:500) und 1,5 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Vor dem Färben der DNA mit 1 Tropfen Citifluor-Lösung (200 µl Citifluor, 8 µl DAPI (1 µg/ml)) wurde fünfmal mit PBS gewaschen. Nach dem Versiegeln des Deckglases mit Nagellack ist der Objektträger bei 4 °C im Dunkeln lagerbar.

Spheroblastieren und Proteaseschutz

100 OD₆₀₀ Zellen wurden nach dem Spheroblastieren mechanisch lysiert. Der unlösliche Zellschrott wurde durch zentrifugieren bei 500 xg/5 min abgetrennt. Die erhaltene Suspension wurde in gleiche Teile aufgetrennt und entweder mit Puffer, Trypsin (0,5 mg/ml), Trypsin (0,5 mg/ml) + Triton X-100 (1 % v/v), Proteinase K (0,5 mg/ml) oder Proteinase K (0,5 mg/ml) + Triton X-100 (1 % v/v) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Verdau durch die Zugabe von TCA (10 % Endkonzentration) gestoppt. Die Proben wurden dann 10 min bei 20000 xg zentrifugiert und das Pellet in Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % w/v SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % w/v Bromphenolblau; 1,5 % w/v Dithiothreitol) gelöst. Anschließend erfolgte SDS-PAGE, Blotten und Immunodetektion.

Deglykosylierung von Proteinen

Zur Deglykosylierung von CPY* wurde das Protein durch alkalische Lyse (Yaffe und Schatz, 1984) isoliert und in 100 µl Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % w/v SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % w/v Bromphenolblau; 1,5 % w/v Dithiothreitol) aufgenommen. Die Probe wurde mit 20 ml IP Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1,25 % v/v Triton X-100; 6 mM EDTA; 190 mM Natriumchlorid) verdünnt, mit 5 µl CPY Antikörper versetzt und 1 h bei RT über Kopf geschüttelt. Anschließend wurde 20 mg Protein A Sepharose zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Die Sepharose wurde mit 500 xg/30 s abzentrifugiert und dreimal mit je 1 ml IP Puffer gewaschen. Danach wurde einmal mit 500 µl Waschpuffer (50 mM Kaliumphosphat pH 5,5; 0,02 % w/v SDS) gewaschen und die Sepharose in 25 µl Endo H Puffer (50 mM Kaliumphosphat pH 5,5; 0,02 % w/v SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol) gegeben. Zur Deglykosylierung wurden 4 mU Endo H zugegeben und beide Proben für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 30 µl Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % w/v SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % w/v Bromphenolblau; 1,5 % w/v Dithiothreitol) gestoppt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Western Blotting und nachfolgender Immunodetektion.

Zur Deglykosylierung der Der1-Fusionsproteine wurde aus 20-40 OD₆₀₀ Zellkultur Membranextrakte isoliert (Egner *et al.*, 1993). Diese wurden dann in 20 µl Puffer A (50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 5,5; 2 % Triton X-100; 1 % SDS; 10 mM EDTA) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Dazu wurden 20 µl Puffer B (50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 5,5; 0,02 % SDS; 10 mM EDTA; 200 mM β-Mercaptoethanol) und 2,5 U Endoglykosidase H gegeben. Die Reaktion wurde nach 1 h bei 37 °C durch Zugabe von 20 µl Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % w/v SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % w/v Bromphenolblau; 1,5 % w/v Dithiothreitol) gestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgte im Western Blot mit anschließender Immunodetektion.

Kolonie-PCR

Zum schnellen Nachweis des Paarungstyps oder von genomischer Integration wurde Zellmaterial (ca. 0,5 mm³) in einem PCR Reagiergefäß verteilt und 1 min in der Mikrowelle bei höchster Stufe erhitzt. Das Zellmaterial wurde in 30 µl PCR-Mischung (3 µl 10x Taq-DNA-Polymerase-Puffer, 1,2 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 0,9 µl Primermix (100 pmol/µl), 0,6 µl dNTP's (10 mM), 15 µl 10 % v/v DMSO und 9,3 µl H₂O) ohne Polymerase resuspendiert und mit Mineralöl überschichtet. Zum Test des Paarungstyps wurden die Oligonukleotide MATalpha 1, MATa 1 und MAT rev mit dem folgenden PCR-Programm verwendet (MATa: 900 bp, MATα: 1000 bp):

- | | | |
|--------------------|--------------|--|
| 1. Zyklus: | 5 min/95 °C | DNA-Denaturierung, |
| | | Zugabe von 0,3 µl Taq-Polymerase (5U), |
| | 2 min/54 °C | Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize, |
| | 3 min/72 °C | DNA-Strangverlängerung |
| 2. Zyklus: | 2 min/95 °C, | 2 min/54 °C und |
| | | 2 min/72 °C |
| 3. bis 33. Zyklus: | 45 s/95 °C, | 45 s/54 °C und |
| | | 1 min/72 °C. |

Durch die Veränderung der Anlagerungstemperatur und der Elongationszeit (1000 bp/min) wurde das Programm für andere Kolonie-PCRs angepasst.

Southern-Blot

2 ml einer Übernachtskultur in YPD wurde 3 min bei 500 xg abzentrifugiert und mit 500 µl H₂O gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl Aufschlusspuffer (2 % Triton X-100; 1 % SDS; 100 mM Natriumchlorid; 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8) resuspendiert und mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 50 µl Glasperlen versetzt. Zum Aufschluss wurden die Proben 10 min bei 4°C gevortext und anschließend bei 20000 xg für 10 min zentrifugiert. Die klare wässrige Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt, 1 ml eiskalter Ethanol zugegeben und 15 min bei -20°C inkubiert. Durch zentrifugieren bei 20000 xg/10 min wurde die ausgefällte DNA abgetrennt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde dann in 400 µl H₂O gelöst und mit RNase A (75 µg/ml Endkonzentration) versetzt und 3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl Ammoniumacetat (5 M) und 1 ml Ethanol durch 10 minütige Inkubation bei -20°C erneut gefällt. Danach wurde 10 min bei 20000 xg zentrifugiert, das erhaltene Pellet getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst. Die chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen über Nacht verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer auf Hybond-N Membran (Amersham) erfolgte mittels Vakuum (Ausubel, 1992) und anschließend wurde die Membran 5 min UV-Licht ausgesetzt. Die Sondenpräparation und Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Amersham, DNA-Star Detektion Kit).

Ergebnisse

Die biochemische und molekularbiologische Analyse der mutierten und daher kurzlebigen vakuolären Proteasen CPY* und PrA* lieferte die Erkenntnis, dass diese Proteine nach dem Transport ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgebaut werden (Finger *et al.*, 1993). Eine daraufhin durchgeführte Mutagenese ermöglichte es, Zellen zu isolieren, die Defekte im ER-Abbau (*der* Mutanten) von CPY* und PrA* aufweisen. Die daraus isolierten rezessiven *der* Mutanten konnten in sieben unterschiedliche Komplementationsgruppen eingeteilt werden (Finger, 1994). Nach der Identifizierung der ersten Gene der *der* Allele zeigte sich, dass CPY* und PrA* nicht im ER abgebaut, sondern zuerst zurück ins Zytosol transportiert und dort vom Proteasom zerstört werden (Hiller *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997). Dieser Prozess wird heute als Teil der Proteinqualitätskontrolle im ER betrachtet und als ER-Degradation oder ER assoziierte Proteindegradation (ERAD) bezeichnet (zusammengefasst in Kostova und Wolf, 2002).

In der vorliegenden Arbeit werden drei zur Proteinqualitätskontrolle im ER gehörende Themengebiete vorgestellt: Im ersten Teil wird die Klonierung der bisher unbekanntem Mutante *der7-1*, sowie einige ihrer Phänotypen beschrieben. Danach folgt eine nähere Charakterisierung des Der1 Proteins und den zu Der1 homologen Proteinen Ydr411c aus *S. cerevisiae* und R151.6 aus *C. elegans*. Zuletzt wird der Einfluss einiger zytosolischer Chaperone auf den Abbau des ERAD Modellsubstrats CPY* untersucht.

Klonierung und Charakterisierung des *der7-1* Mutantenallels

In den folgenden Kapiteln werden einige der von dem *der7-1* Allel hervorgerufenen Phänotypen sowie die Identifizierung des betroffenen Gens beschrieben. Diese Mutante wurde ausgewählt, da sie zusätzlich zum bekannten Abbaufekt der ERAD Substrate CPY* und PrA*, als weiteres phänotypisches Merkmal, eine verringerte elektrophoretische Mobilität dieser Proteine bewirkt (Finger, 1994).

Wechsel des Stammhintergrundes zu W303

Da der Originalmutantenstamm YFI277 einen Wachstumsphänotyp aufwies, wurde er gegen den Stamm W303-1C rückgekreuzt. Dadurch wird die Mutation in einen zu weiteren ERAD Mutanten isogenen Stammhintergrund gebracht. Beim Rückkreuzen stellte sich heraus, dass der Stamm YFI277 homozygot diploid bezüglich des Paarungstyps ist. Deshalb wurde zur ersten Rückkreuzung ein homozygot diploider Stamm aus dem W303-1C Hintergrund (YCT339) verwendet. Die nach der Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen waren diploid und heterozygot bezüglich des Paarungstyps. Durch immunologische Detektion von CPY* wurden diejenigen Sporen, die das *der7-1* Allel homozygot enthielten, identifiziert. Das wurde anschließend durch Verfolgen des CPY* Abbaus in diesen Stämmen überprüft. Wie in Abbildung 3 zu sehen, ist in einer bezüglich *der7-1* homozygot diploiden Mutante der Abbau

des Substratproteins CPY*, im Vergleich zum heterozygot diploiden *der7-1/DER7* „Wildtyp Stamm“, verzögert. Gleichzeitig ist das Signal von CPY* zu höherem Molekulargewicht hin verschoben.

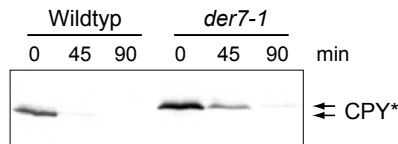


Abbildung 3: **CPY* besitzt in einer *der7-1* Mutante eine verringerte elektrophoretische Mobilität und wird langsamer abgebaut.** Diploide Zellen des heterozygoten Wildtyps (*DER7/der7-1*) und der homozygoten Mutante (*der7-1/der7-1*) wurden bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 2,5 angezogen und mit Cycloheximid versetzt (Zeitpunkt 0 min). Die Abbaukinetik wurde über 90 min verfolgt. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit αCPY Antikörpern.

Die bezüglich *der7-1* homozygote Spore wurde anschließend sporuliert und die Tetraden vereinzelt. Dabei wurde festgestellt, dass der in der YFI277 Mutante beobachtete Wachstumsphänotyp nicht mit der *der7-1* Mutation einhergeht. Für die folgenden drei Rückkreuzungen wurde eine normal wachsende, das *der7-1* Allel enthaltende Spore verwendet und mit dem Stamm W303-1C gekreuzt. Daraus wurden die Stämme W303-1C *der7-1* (YRH54 und YRH55) erhalten (nicht gezeigt).

Der7-1 verändert das Molekulargewicht glykosylierter Proteine

Eine zu klärende Frage war nun, ob das *der7-1* Allel nur das Laufverhalten der Proteine CPY* und PrA* im elektrischen Feld beeinflusst, oder ob Proteine im Allgemeinen von ihr betroffen sind. Wie in Abbildung 4 zu sehen, werden auch die glykosylierten Proteine Wbp1 und Pep4 durch die *der7-1* Mutante im Laufverhalten in der SDS-PAGE beeinflusst. Im Gegensatz dazu ist die Beweglichkeit von nicht glykosyliertem Sec61 Protein nicht verändert.

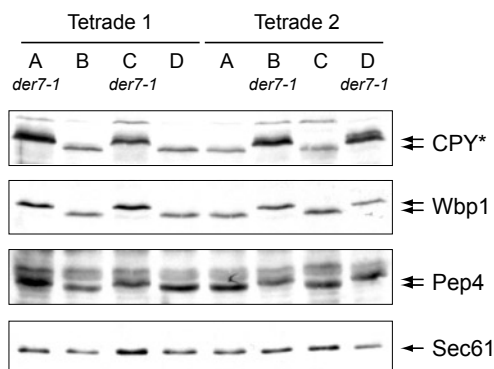


Abbildung 4: ***Der7-1* beeinflusst die elektrophoretische Beweglichkeit glykosylierter Proteine.** Western Blot Analyse der glykosylierten Proteine Wbp1 und Pep4, sowie des nicht glykosylierten Sec61 Proteins, in den Sporen zweier Tetraden einer bezüglich *der7-1/DER7* heterozygot diploiden Hefe. Die Zellen wurden bei 30 °C bis zur frühstationären Phase angezogen. Die Immunodetektion der Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen CPY, Wbp1, Pep4 und Sec61.

Eine mögliche Erklärung für die im *der7-1* Allel auftretende verringerte elektrophoretische Mobilität wäre eine Molekulargewichtserhöhung dieser Proteine, hervorgerufen durch eine nicht gereifte Polypeptidkette oder eine modifizierte Oligosaccharidstruktur. Da die Mobilitätsänderung nur bei glykosylierten Proteinen (CPY*, PrA*, Pep4 und Wbp1) auftrat,

wurde zunächst die N-Glykosylierung näher untersucht. Dazu wurde CPY* immunologisch aus Wildtyp und *der7-1* Mutante isoliert und die Oligosaccharide durch Behandlung mit Endoglykosidase F vom Proteinteil abgespalten. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, ist nach der Abspaltung der Oligosaccharide kein Unterschied im Molekulargewicht der deglykosylierten Proteine feststellbar (Molekulargewicht der deglykosylierten CPY* ist ca. 57 kDa).

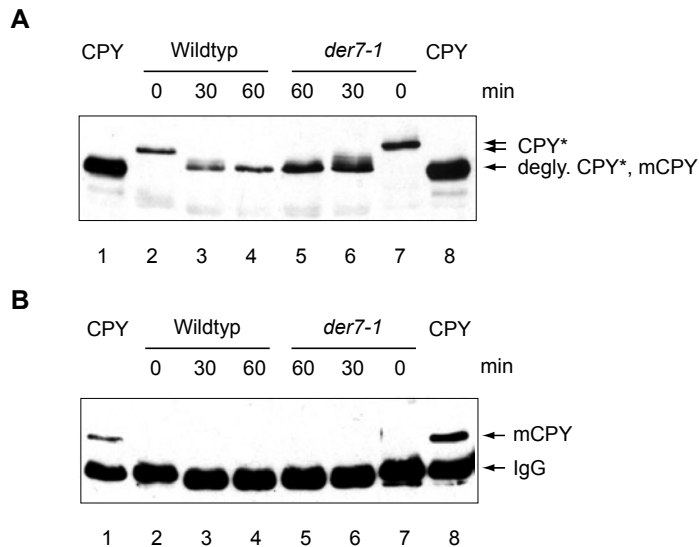


Abbildung 5: Deglykosylierte CPY* aus Wildtyp und *der7-1* Mutante besitzen dasselbe Molekulargewicht.

Die Modifikation von CPY* in einer *der7-1* Mutante ist nicht durch golgi-typische 1,6-Mannosylierung entstanden. (A) Aus frühstationären Zellen von Wildtyp und *der7-1* Mutante wurde CPY* immunologisch gefällt und mit Endoglykosidase F behandelt (Zeit 0, 30, 60 min). Als Kontrolle wurde käuflich erworbene vakuoläre mCPY verwendet. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit α CPY. (B) Immunodetektion von golgi-typischer 1,6-Mannosylierung mit α 1,6 Antikörper.

Da Oligosaccharide an verschiedenen Orten des sekretorischen Wegs modifiziert werden können, wurde überprüft, ob die Erhöhung des Molekulargewichts von CPY* durch golgi-typische 1,6-Mannosylierung hervorgerufen wird. Dazu wurde der Western Blot aus Abbildung 5A mit Antikörpern angefärbt, welche spezifisch golgi-typische 1,6-Mannosylierung erkennen. In Abbildung 5B ist zu sehen, dass vakuoläre Wildtyp CPY (63 kDa) im Golgi durch 1,6-Mannosylierung modifiziert wurde (Spur 1 und 8), nicht aber CPY* in *der7-1* Mutanten (Zeitpunkt 0 min, Spur 2 und 7). Das Molekulargewicht von CPY* wird in einem *der7-1* Mutantenstamm also durch eine modifizierte N-Glykosylierung und nicht durch golgi-typische Glykosylierung vergrößert.

Identifizierung des *der7-1* Lokus

Wie gezeigt, besitzen glykosylierte Proteine in Mutanten mit einem *der7-1* Allel eine, mit der N-Glykosylierung der Proteine zusammenhängende, verringerte elektrophoretische Mobilität. Diese kann durch eine Überglykosylierung verursacht werden. Eine Überglykosylierung von Glykoproteinen kann durch eine unvollständige Reifung der im endoplasmatischen Retikulum auf die Proteine übertragenen $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ Oligosaccharide entstehen. Mögliche Kandidaten für die *DER7* kodieren könnte, sind deshalb die Oligosaccharid prozessierenden Enzyme Glukosidase I (Cwh41) (Romero *et al.*, 1997), Glukosidase II (Rot2) (Trombetta *et al.*, 1996) und α 1,2-Mannosidase (Mns1) (Camirand *et al.*, 1991). Da die Glukosidasen insgesamt einen größeren Effekt auf die Änderung des Molekulargewichts ausüben – sie spalten insgesamt

drei Glucosereste je $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ N-Glykosid ab, α 1,2-Mannosidase dagegen nur einen Mannoserest – wurden sie zuerst untersucht (zusammengefasst in Herscovics, 1999). Dazu wurden diploide Hefen durch Kreuzung der Stämme W303-1C *der7-1* Allel (YRH55) mit Nullmutanten von Glukosidase I (YG744) und Glukosidase II (YG427) erzeugt. Da *der7-1* ein rezessives Allel ist, sollte die veränderte Beweglichkeit von Glykoproteinen in einer heterozygot diploiden Doppelmutante aufgehoben sein, in bezüglich des Allels homozygoten Mutanten jedoch erhalten bleiben. Wie die immunologische Detektion der Proteine Wbp1 und Pep4 im Western Blot zeigt, bleibt nur im Stamm YRH118 (*der7-1*/ Δ *cwh41*) der Phänotyp erhalten (Abbildung 6, Spur 2). Im Stamm YRH119 (*der7-1*/*DER7* Δ *rot2*/*ROT2*) hingegen (Abbildung 6, Spur 3) ist das Molekulargewicht von Wbp1 und Pep4 nicht von dem im diploiden Wildtyp zu unterscheiden (Abbildung 6, Spur 1 und 7). Betrachtet man die Einzelmutanten (Abbildung 6, Spur 4 bis 6), so ist die Größe der Molekulargewichtsänderung von Wbp1 und Pep4 in den Stämmen *der7-1* und Δ *cwh41* gleich, in Δ *rot2* jedoch etwas kleiner. *DER7* scheint daher allelisch zum Glukosidase I kodierenden Gen *CWH41* zu sein.

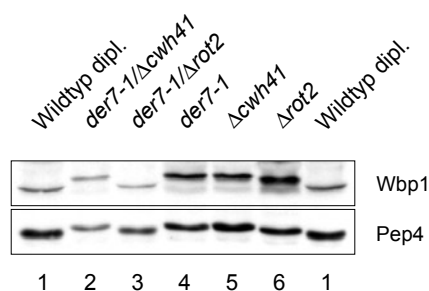


Abbildung 6: **Glykosylierte Proteine in diploiden *der7-1*/ Δ *cwh41* Hefen verhalten sich wie in den haploiden Ausgangsstämmen.**

Die das *der7-1* Allel tragende Mutante wurde mit Glukosidase I (*CWH41*) und Glukosidase II (*ROT2*) deletierten Stämmen gekreuzt. In den so erzeugten diploiden Hefen (YRH118, YRH119; Spur 2 und 3) wurde die elektrophoretische Mobilität der glykosylierten Proteine Wbp1 und Pep4 untersucht. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte des diploiden Stamms W303-1C (Spur 1 und 7), sowie der haploiden Ausgangsstämme *der7-1* (YRH55; Spur 4), Δ *cwh41* (YG744; Spur 5) und Δ *rot2* (YG427; Spur 6) aufgetragen. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit α Wbp1 und α Pep4 Antikörpern.

Komplementation von *der7-1* durch Expression von Glukosidase I

Um auszuschließen, dass Δ *cwh41* ein nichtallelisches, nichtkomplementierendes Gen darstellt, wurde zusätzlich die Expression von plasmidkodierter Glukosidase I im *der7-1* Allel untersucht. In den erhaltenen Stämmen wurde das Laufverhalten von CPY* im SDS-PAGE analysiert und mit dem von CPY* in nicht plasmidtragenden Sporen verglichen (Abbildung 7). Die Sporen A und D enthalten das *der7-1* Allel, erkennbar am erhöhten MW von CPY*. Die Expression von Glukosidase I in diesen Stämmen komplementiert teilweise den Phänotyp (Abbildung 7, Spur 5 und 8). In Wildtypzellen hat die Expression von Glukosidase I keinen Einfluss auf das Laufverhalten von CPY*. Die in der *der7-1* Mutante (Abbildung 7, Spur 1 und 4) zusätzlich auftretende Bande ist möglicherweise auf golgi-typische 1,6-Mannosylierung von CPY* zurückzuführen. Dieses Phänomen wird bei Überladung des Rückhaltesystems im

ER beobachtet. Lösliche ERAD Substrate entkommen bei Blockade des Abbaus teilweise in das sekretorische System und können dadurch weitere Modifikationen an den Zuckerresten erhalten (Knop *et al.*, 1996a; Taxis *et al.*, 2002).

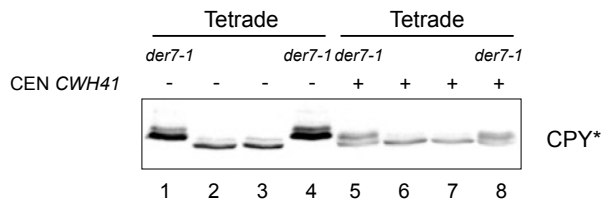


Abbildung 7: **Plasmidkodierte Glukosidase I komplementiert partiell die *der7-1* Mutation.**

Vier Sporen einer Tetrade des heterozygot diploiden *der7-1/DER7* Hefestamms wurden mit dem konstitutiv Glukosidase I exprimierenden Plasmid pBPH1-CWH41 transformiert. In stationären Zellen wurde mit Western Blot Analyse die unterschiedlichen Formen von CPY* in plasmidtragenden und nicht plasmidtragenden Sporen detektiert. Die Immunodetektion erfolgte mit α CPY Antikörper.

Meiotische Kartierung von *DER7*

Um abschließend zu klären, ob *DER7* dem für Glukosidase I kodierenden Gen *CWH41* entspricht, wurde eine meiotische Kartierung („meiotic mapping“) des *der7-1* Allels durchgeführt. Dabei wird die Eigenschaft diploider Hefen ausgenutzt, bei der Verdopplung der DNA in der Meiose, Genloci beider Mutterstränge auf einen neu synthetisierten Tochterstrang zu vererben. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Genloci eines Chromosoms von unterschiedlichen Muttersträngen stammen, hängt von ihrem Abstand zueinander ab. Je kleiner der Abstand, desto unwahrscheinlicher ist es, dass Gene unterschiedlicher Mutterstränge übertragen wurden. Dieses Phänomen kann zur Kartierung von Genen desselben Chromosoms benutzt werden (Guthrie und Fink, 1991).

Geht man nun aufgrund der bereits erhaltenen Ergebnisse davon aus, dass die Genloci von *der7-1* und *CWH41* allelisch sind, so müssen beide auch dieselbe chromosomale Umgebung besitzen. Abbildung 8 zeigt die Umgebung des für Glukosidase I kodierenden Gens *CWH41* auf dem Chromosom VII. Mit Hilfe des direkt benachbarten Gens *TRP5* wird im Folgenden gezeigt, dass *der7-1* – ebenso wie *CWH41* – mit *TRP5* genetisch verbunden ist. Dazu wurde aus YRH55 (W303-1C *der7-1*) und einem $\Delta trp5::KAN^R$ Stamm (YRH157) eine heterozygot diploide Hefe (*der7-1/DER7 TRP5/\Delta trp5*) erzeugt. Wenn also *der7-1* und *TRP5* benachbarte Gene sind, sollten, nach dem Sporulieren und Tetradisdissektion der heterozygoten Hefe, keine Sporen, bzw. nur sehr wenige, gleichzeitig einen *der7-1* Phänotyp (Änderung des Molekulargewichts glykosylierter Proteine) sowie Geneticin Resistenz ($\Delta trp5::KAN^R$) besitzen. Zunächst wurde das Wachstum der erhaltenen Sporen auf Medium ohne Adenin (*ade2-1/ADE2*) und auf Medium mit Geneticin (*TRP5/\Delta trp5::KAN^R*) kontrolliert. Tetraden, die eine korrekte Mendelsche Verteilung beider Wachstumsmarker zeigten, wurden anschließend immunologisch auf eine Änderung des Molekulargewichts der Proteine Wbp1 bzw. CPS untersucht (Abbildung 9). Wie erwartet, zeigte keine Spore, von insgesamt 38 analysierten Tetraden, gleichzeitig einen

der7-1 Phänotyp und Geneticin Resistenz. Chromosomal betrachtet heißt das: *der7-1* liegt, wie *CWH41*, nahe bei *TRP5*.

Fasst man abschließend die Ergebnisse der Komplementation und der Kartierung des *der7-1* Allels zusammen, bedeutet dies, dass *DER7* und das für Glukosidase I kodierende Gen *CWH41* identisch sind.

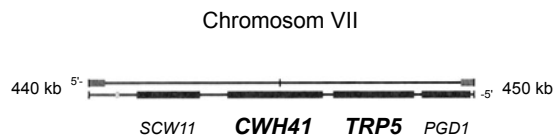


Abbildung 8: **Chromosomale Umgebung von *CWH41***. Ausschnitt aus Chromosom VII zwischen den Koordinaten 440 und 450 kb. Die für Glukosidase I und *Trp5* kodierenden Gene sind benachbart (SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces).

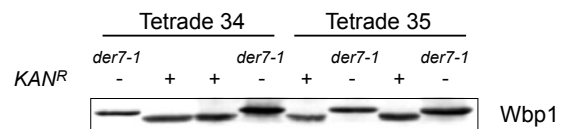


Abbildung 9: **Das für *DER7* kodierende Gen liegt in der Nähe des *TRP5* Lokus.** Ein bezüglich *der7-1/DER7 TRP5/Δtrp5* heterozygot diploider Hefestamm (YRH54xYRH156) wurde sporuliert und einer Tetradendisektion unterworfen. Die Sporen von 38 Tetraden wurden auf Geneticin Resistenz (*Δtrp5::KAN^R*) und das Auftreten des *der7-1* Phänotyps (Erhöhung des Molekulargewichts glykosylierter Proteine) untersucht. Beispielhaft ist der Gleichgewichtsgehalt des Proteins Wbp1 in stationären Zellen aller Sporen der Tetraden 34 und 35 gezeigt. Die Detektion erfolgte mit α Wbp1 Antikörpern.

Genetische Interaktion von *Der7* und *Ire1*

Die Arbeiten von Casagrande *et al.* (2000), Friedländer *et al.* (2000), Ng *et al.* (2000) und Travers *et al.* (2000) konnten zeigen, dass ERAD und UPR („unfolded protein response“) eng verknüpfte Prozesse sind. Die Hefezelle hat zwei Möglichkeiten endoplasmatischen Stress abzubauen: Sie kann zum Einen, die Menge von Proteinen der Faltungsmaschinerie und des sekretorischen Wegs erhöhen (UPR), oder zum Anderen, toxische Proteine aus dem ER durch Abbau entfernen (ERAD). Werden beide Systeme gleichzeitig blockiert, reagieren die Zellen empfindlich gegenüber zusätzlichem Stress. Doppelmutanten mit defekter ER-assoziiierter Degradation und defektem UPR besitzen deshalb ein temperaturabhängiges Wachstumsverhalten.

Da in *der7-1* Mutanten die ER-assoziierte Degradation beeinträchtigt ist, wurde untersucht, ob die Kombination der *der7-1* Mutation zusammen mit defektem UPR zu konditionalen Wachstumsdefekten führt. Abbildung 10 zeigt das Wachstum von Wildtyp, *der7-1* (YRH55), *Δire1* (YRH68) und *der7-1 Δire1* (YRH71) Doppelmutante bei 30 °C und 37 °C. Bei 30 °C können die *der7-1* Einzel- und Doppelmutanten (minimal kleinere Kolonien) kaum vom Wildtyp unterschieden werden. Erhöht man jedoch die Temperatur, treten bei allen drei Mutanten Wachstumsdefekte auf. Bei 37 °C ist das Wachstum der *der7-1* Einzelmutante leicht, das der *der7-1 Δire1* Doppelmutante stark verlangsamt. Eine Erhöhung der Temperatur auf 38,5 °C bewirkt auch ein beeinträchtigtes Wachstum des *Δire1* Stamms, die *der7-1 Δire1*

Doppelmutante ist tot (nicht gezeigt). Das bedeutet, dass eine defekte Prozessierung der Oligosaccharidreste, wie im *der7-1* Stamm vorhanden, den Stresspegel im ER erhöht.

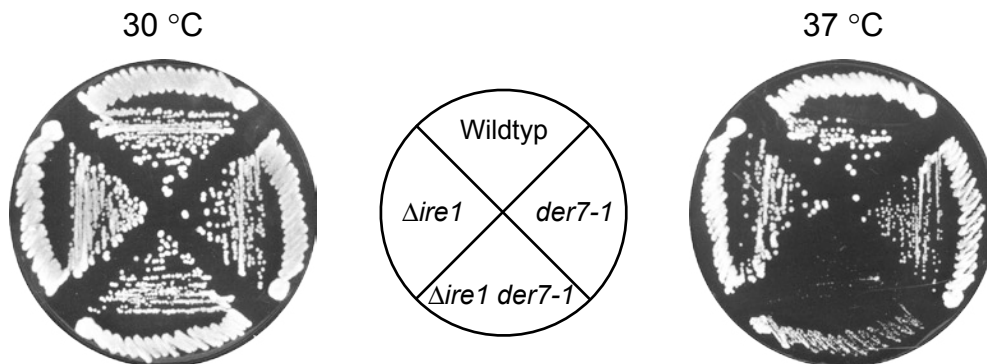


Abbildung 10: **Das Abschalten des UPR führt in *der7-1* Mutanten zur Temperatursensitivität.** Die Stämme mit den Mutationen *der7-1* (YRH55), *Δire1* (YRH68) und *der7-1 Δire1* (YRH71) wachsen bei 30 °C vergleichbar zum isogenen Wildtyp W303-1C. Bei 37 °C ist das Wachstum der *der7-1* Mutante leicht, das der *der7-1 Δire1* Doppelmutante stark beeinträchtigt.

Eigenschaften von Der1 und zu Der1 homologen Proteinen

Zwei weitere in A. Fingers Arbeiten identifizierte Mutantenallele, die eine defekte ER-Degradation verursachten, waren *der1-1* und *der1-2*. Beide gehören derselben Komplementationsgruppe an. Das zu *der1-2* gehörende Gen *DER1* wurde im Rahmen der Dissertation von M. Knop komplementiert und charakterisiert (Knop *et al.*, 1996a). Es kodiert für ein 211 AS (24 kDa) großes, in der ER-Membran lokalisiertes Protein, welches zum Abbau von CPY* und PrA* notwendig ist. Obwohl Der1 zu den am stärksten durch die UPR induzierten Proteine der Hefe *S. cerevisiae* gehört (Travers *et al.*, 2000), ist bis heute wenig über seine Funktion in der ER-assoziierten Degradation bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle des Proteins Der1 bei der ER-Degradation und seine Membrantopologie weiter untersucht. Anschließend wurde versucht, durch Suppression des *der1-2* Mutantenallels mittels einer Genbank, mit Der1 interagierende Proteine zu identifizieren.

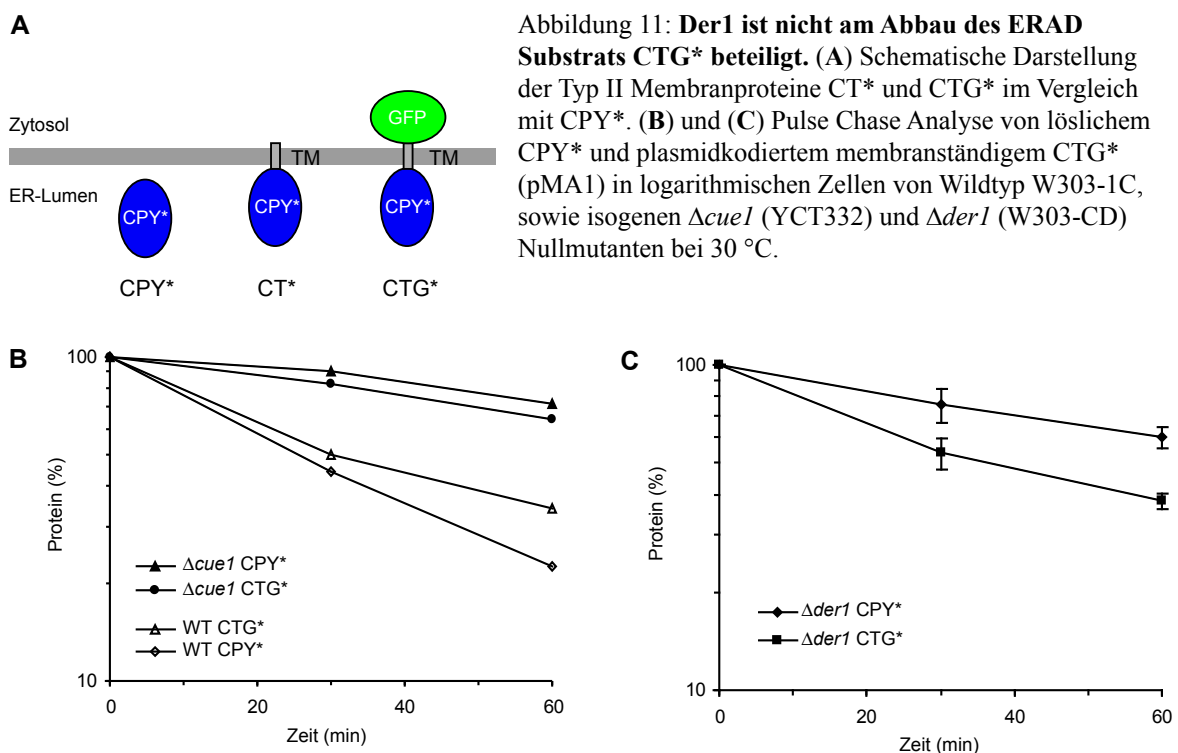
Substratspektrum von Der1

In den letzten Jahren wurden *Δder1* Mutanten immer wieder auf ihre Beteiligung am Abbau unterschiedlicher Substrate der ER-assoziierten Degradation getestet (Auflistung in Fewell *et al.*, 2001). Einflüsse des Der1 Proteins konnten jedoch nur beim Abbau löslicher Proteine wie PrA*, CPY* (Finger *et al.*, 1993; Knop *et al.*, 1996a) und KNH_t (Vashist *et al.*, 2001) gefunden werden. Da sich diese Ergebnisse aber auf die Untersuchung unterschiedlicher Proteine stützen, war es unsicher, allgemeingültige Aussagen bezüglich der Substratpräferenz von Der1 zu treffen. Die Verwendung vergleichbarer, da allein auf CPY* als Abbausignal basierenden ERAD Modells substraten ermöglichte das Substratspektrum von Der1 aufzuklären.

Gemeinsam mit C. Taxis wurde das Modellsubstrat CTG* (CPY* + Transmembransegment + grün fluoreszierendes Protein) konstruiert (Abbildung 11A). Während CPY* ein lösliches ER-luminales ERAD Protein darstellt, ist CTG* ein Typ I Membranproteine mit ER-luminalem N-Terminus und zytosolischem C-Terminus. Wichtigstes Merkmal beider Modellsubstrate ist ihr gemeinsames Abbausignal: Die Missfaltung von CPY* im ER-Lumen (Taxis, 2002).

Der Einfluss des Der1 Proeins auf die Degradation dieser ERAD Substrate wurde mittels „Pulse Chase“ Analyse untersucht. Dazu wurde die Kinetik des Abbaus radioaktiv markierter CPY* und CTG* im Wildtyp, in einer $\Delta cue1$ Nullmutante (Abbildung 11B) und in einer $\Delta der1$ Nullmutante gemessen (Abbildung 11C). Wie erwartet, wird das lösliche Substrat CPY* im Wildtyp mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min abgebaut, in $\Delta der1$ und $\Delta cue1$ Mutanten jedoch stabilisiert (Biederer *et al.*, 1997; Finger *et al.*, 1993; Knop *et al.*, 1996a). Betrachtet man jedoch das Membranprotein CTG*, so ändert sich der Einfluss des Der1 Proteins. Während die Abwesenheit des Proteins Cue1 auch den Abbau von CTG* stark beeinträchtigt, wird es in einer $\Delta der1$ Nullmutante wie im Wildtyp abgebaut. Obwohl also beide ERAD Substrate dasselbe Abbausignal (missgefaltete CPY*) tragen, beeinflusst Der1 nur die Degradation von löslichem ER-luminalen CPY*. Das Protein Der1 scheint also spezifisch zum Abbau löslicher Proteine notwendig zu sein.

Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Untersuchung des Abbaus von CT*, einem membranständigen CPY* ohne GFP-Domäne. Wie CTG*, wird auch CT* unabhängig von Der1 degradiert (C. Taxis, persönliche Mitteilung). Der Einfluss weiterer Komponenten der ER Qualitätskontrolle und des proteasomalen Abbaus auf die Degradation von CT* und CTG* ist in Taxis (2002) beschrieben.



Spezifische Antikörper gegen Der1

Zum biochemischen Nachweis des Der1 Proteins wurden Antikörper gegen zwei Peptide aus Der1 hergestellt (siehe Material und Methoden). Ausgewählt wurden die Peptidsegmente NHLSTLENSFNLRKFC (Aminosäuren 79-95) und YELKKNGNQMNVR+C (Aminosäuren 129-141 +C). Beide Peptide vereinigen die Eigenschaft hoher Antigenizität und niedriger Hydrophobizität, was auf eine Lokalisierung der jeweiligen Protein-Segmente – zwischen den mutmaßlichen Membrandomänen TM2/TM3 bzw. TM3/TM4 von Der1 – an der Proteinoberfläche hindeutet (Abbildung 12 und Knop *et al.*, 1996a).

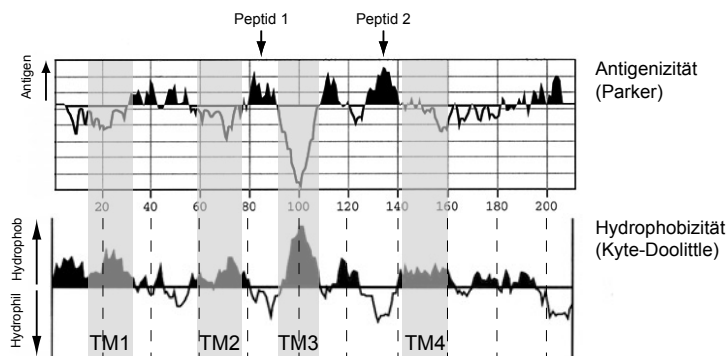


Abbildung 12: **Antigene Bereiche von Der1.** Dargestellt ist die Parker-Antigenizität (MacVector 7.0, Oxford Molecular), die Kyte-Doolittle Hydrophobizität (Lasergene, DNASTAR, Inc.) sowie die Lage der mutmaßlichen Transmembrandomänen von Der1. Die Pfeile markieren die Lage der zur Antikörperbildung verwendeten Peptide NHLSTLENSFNLRKFC (Aminosäuren 79-95) und YELKKNGNQMNVR +C (Aminosäuren 129-141 +C).

Die Spezifität der erhaltenen Antikörper wurde durch den Vergleich von Der1, bzw. von C-terminal epitopmarkiertem Der1 Protein (Der1-HA), mit einer $\Delta der1$ Nullmutante überprüft. Die Proteine Der1 und Der1-HA wurden dazu von den Plasmiden pRS425DER1 und pRS425DER1-HA (Knop, 1996) in einer $\Delta der1$ Deletionmutante überexprimiert. Die im Western Blot sichtbaren Banden stimmen mit dem Molekulargewicht von Der1 (24 kDa) beziehungsweise Der1-HA (25 kDa) überein (Abbildung 13). Die erzeugten Antikörper erkennen also spezifisch das Der1 Protein.



Abbildung 13: **Der gegen Peptide aus Der1 gerichtete Antikörper erkennt selektiv das Der1 Protein.** Western Blot Analyse von überexprimiertem plasmidkodiertem Der1 bzw. Der1-HA in Membranextrakten aus spätlogarithmischen W303-CD ($\Delta der1$) Zellen (Spur 2 und 3). Die Immunodetektion des Proteingleichgewichtes erfolgte mit α Der1 Antikörpern.

Da eine spätere Serumcharge eine verstärkte Kreuzreaktivität bei der Immunodetektion des Der1 Proteins zeigte, wurde diese mit Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Material und Methoden).

Bestimmung der Topologie von Der1

Zum Zeitpunkt der Arbeit waren mit Hilfe computergestützter Berechnungen vier Membrandomänen für Der1 vorgeschlagen worden (Knop *et al.*, 1996a). Um später weitere Aussagen bezüglich der Funktion von Der1 treffen zu können, sollte deshalb die genaue Membrantopologie bestimmt werden.

Charakteristika des Aminoterminus

Alle sekretorischen Proteine tragen bei ihrem Eintritt ins ER eine hydrophobe Signalsequenz (ER-Importsequenz), die das Protein in der ER-Membran verankern. Bei einigen Proteinen wird dann die Signalsequenz durch die Signalpeptidase prozessiert, wodurch der neu entstandene N-Terminus in das Lumen des ER entlassen wird (Blobel und Dobberstein, 1975; Milstein *et al.*, 1972).

Zur Charakterisierung des N-Terminus des Der1 Proteins wurde die Prozessierung der Signalsequenz von Der1 (Aminosäuren 16-32) (Knop *et al.*, 1996a) in Hefen mit der temperatursensitiver Signalpeptidase-Untereinheit *spc3-4* (Fang *et al.*, 1997) untersucht. Dazu wurde das Protein Der1-HA in der Hefe HFY406 bei 25 °C und 37 °C (restriktive Temperatur) exprimiert. Anschließend wurde Der1 mit Antikörper gegen das HA-Epitop immunologisch sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 14A zu sehen, ist das Molekulargewicht von Der1-HA

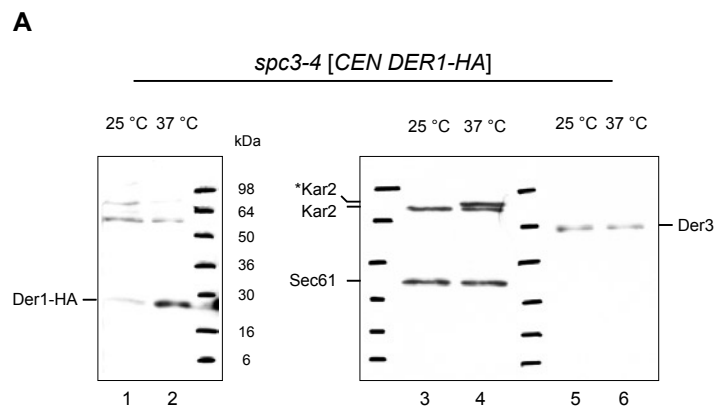
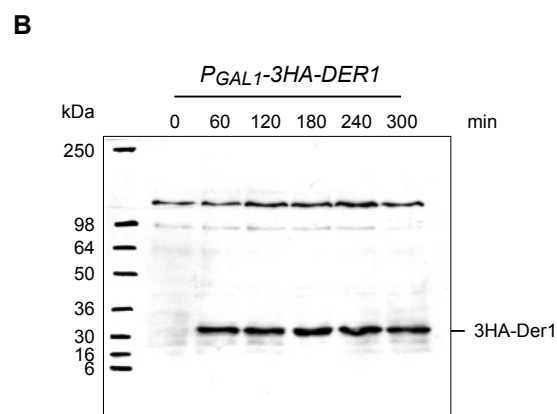


Abbildung 14: **Die Signalsequenz von Der1 wird nicht prozessiert.** (A) Die Plasmid (pRS315DER1-HA) tragende Signalpeptidasemutante *spc3-4* (HFY406) wurde in CM -Leucin Medium bei 25 °C bis zur logarithmischen Phase angezogen, die Kultur geteilt und jeweils für eine weitere Stunde bei 25 °C bzw. 37 °C (restriktive Temperatur) inkubiert. Die immunologische Detektion des Proteins Der1-HA erfolgte mit α HA Antikörper (Spur 1 und 2). Zur Kontrolle wurde in denselben Extrakten die Proteine Kar2, Sec61 (Spur 3 und 4) und



Der3 (Spur 5 und 6) mit den entsprechenden polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Das Sternchen (*) kennzeichnet das bei 37 °C auftretende, nicht prozessierte Kar2 Vorläuferprotein (Spur 4). Es ist gut zu erkennen, wie Der1-HA und Kar2 durch ER-Stress induziert werden. (B) Der Stamm YRH73 (*P_{GAL1}-3HA-DER1*) wurde bei 30 °C in YP Medium mit 2 % Raffinose bis zur logarithmischen Phase angezogen. Die Expression des Proteins 3HA-Der1 wurde durch Zugabe von Galaktose (2 % v/v) induziert und Proben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die SDS-PAGE (Gradient: 10-18%) wurde vor dem Austreten der Lauffront gestoppt. Die Immunodetektion von 3HA-Der1 erfolgte mit gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpern.

bei 25 °C und 37 °C (Abbildung 14A, Spur 1 und 2) gleich groß. Das gleiche gilt für die Proteine Sec61 (Abbildung 14A, Spur 3 und 4) und Der3 (Abbildung 14A, Spur 5 und 6). Ihr Signalpeptid wird nicht abgespalten und bildet dadurch eine Transmembrandomäne aus. Das lösliche Protein Kar2 (Abbildung 14A, Spur 3 und 4) erfährt hingegen eine Prozessierung der ER-Importsequenz. Bei inaktiver Signalpeptidase tritt deshalb eine zusätzliche Bande bei höherem Molekulargewicht auf (Abbildung 14A, Spur 4).

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die immunologische Detektion von aminoterminal 3-fach HA markiertem Der1 (3HA-Der1). Das erhaltene Signal trat bei der berechneten Größe von ca. 29 kDa (Abbildung 14B) auf. Kleinere 3HA-Fragmente waren nicht sichtbar. Es ist allerdings einschränkend zu sagen, dass N-terminal markiertes Der1 biologisch inaktiv ist (Knop, 1996; siehe Kapitel „Biologische Aktivität modifizierter Der1 Proteine“). Es könnte deshalb die Abspaltung der Signalsequenz möglicherweise gestört sein.

Orientierung hydrophiler Der1 Segmente

Der Nachweis weiterer mutmaßlicher Transmembrandomänen (TM) wurde indirekt, durch die Markierung hydrophiler Bereiche des Der1 Proteins, durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Invertasefragment (Suc2A) in das Zielprotein eingefügt (Gilstring und Ljungdahl, 2000). Das Molekulargewicht des Fusionsproteins ist von der Lokalisierung des Reporterfragments abhängig. Befindet sich der markierte Bereich im Lumen des ER, wird das Invertasefragment glykosyliert. Das Fusionsprotein besitzt deshalb ein erhöhtes Molekulargewicht und kann vom nicht glykosylierten, zytosolisch orientierten Reporterprotein unterschieden werden.

Als Ausgangspunkt zur Bestimmung der Zahl der Membransegmente von Der1 wurden die Angaben von M. Knop (Knop *et al.*, 1996a) verwendet (vergleiche Abbildung 12). Nach dieser Vorlage wurde dann das Reporterprotein Suc2A mittig, zwischen zwei mutmaßliche Transmembrandomänen, eingefügt. Die so erzeugten Der1-Suc2A-Reporterproteine tragen die Insertionen jeweils zwischen den Aminosäuren D45/L46 (pHIT114), sowie E85/N86 (pHIT115) und Y128/Y129 (pHIT116) (Abbildung 15A). Zur besseren immunologischen Nachweisbarkeit der Der1-Reporter-Konstrukte wurden sie in ein Überexpressionsplasmid umgesetzt (pHIT124, pHIT125 und pHIT126). Abbildung 15B zeigt die Größen der unterschiedlichen Der1-Fusionsproteine vor und nach der Behandlung mit Endoglykosidase H. Das Einfügen der Invertase Fragmente zwischen den Aminosäuren D45/L46 und Y128/Y129 führt, wegen der Glykosylierung der Reporterproteine, zu einer Molekulargewichtserhöhung (Abbildung 15A, Spur 2 und 3, sowie 6 und 7). Das heißt, die der Signalsequenz (TM1) folgenden hydrophilen Aminosäuren um D45/L46, sowie die Aminosäuren im Bereich um Y128/Y129, sind dem ER-Lumen zugewandt. Dagegen verursacht die Insertion des Reporterproteins an der Stelle E85/N86 keine Veränderung des Molekulargewichts (Abbildung 15A, Spur 4 und 5). Diese Aminosäuren befinden sich also im Zytosol.

Daraus folgt, dass der N-Terminus von Der1 im Zytosol lokalisiert ist und zusätzlich zur Signalsequenz (TM1) zwei weitere Transmembrandomänen (TM2 und TM3) vorhanden sind. Die Lokalisierung des C-Terminus kann mit diesen Der1-Reporterproteinen nicht bestimmt werden und wurde deshalb mit weiteren Experimenten untersucht.

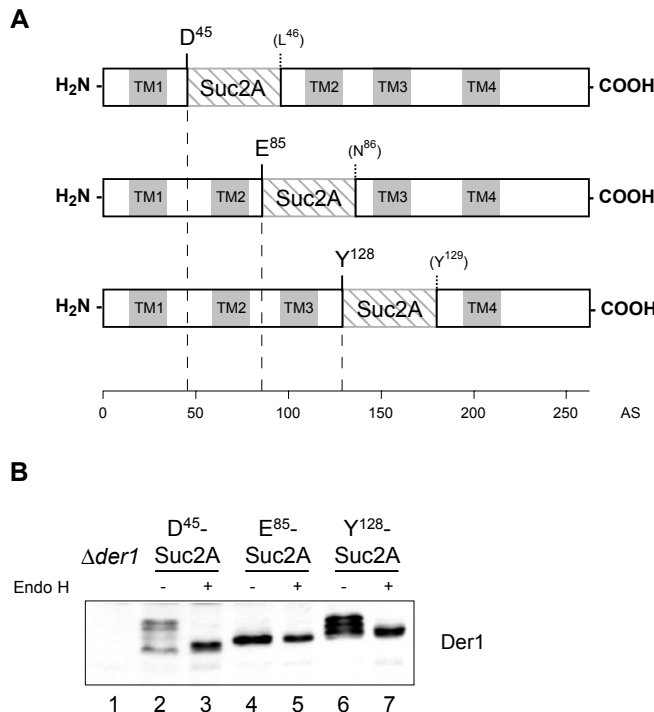


Abbildung 15: **Die Aminosäuren D45 und Y128 von Der1 befinden sich im ER Lumen und sind durch zwei Transmembrandomänen (TMs) getrennt.** (A) Schematische Darstellung der, zum indirekten Nachweis der Der1-Transmembrandomänen TM2 und TM3 verwendeten, topologiesensitiven Der1-Suc2A Fusionsproteine. Die Invertase-Fragmente (Suc2A) wurden jeweils zwischen den angegebenen Aminosäuren in Der1 eingefügt. (B) SDS-PAGE von Membranextrakten der plasmidkodierte Der1-Suc2A Fusionsproteine (pHIT124/125/126) in W303-CD (Δ *der1*). Aufgetragen sind die Membranextrakte logarithmischer Zellen mit und ohne Endoglykosidase H Behandlung (1h, 37 °C). Zum immunologischen Nachweis wurde α Der1 Antikörper verwendet.

Lokalisierung des Carboxyterminus

Um die Existenz einer vierten Transmembrandomäne (TM4) in Der1 und die Orientierung des Carboxyterminus von Der1 aufzuklären, wurden zwei verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Zuerst wurde am C-Terminus von Der1 eine Asp-X-Ser/Thr Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung eingefügt (Der1-G; pHIT135). Damit kann eine Lokalisierung des C-Terminus im Lumen des ER, anhand einer Erhöhung des Molekulargewichts des Proteins Der1-G durch Glykosylierung, sichtbar gemacht werden (Deak und Wolf, 2001). Wie in Abbildung 16A zu sehen, ist keine Änderung in der Größe von Der1-G im Vergleich zum Wildtyp oder der mit Endoglykosidase H behandelten Probe zu erkennen. Der C-Terminus von Der1 sollte daher im Zytosol lokalisiert sein. Es bleibt aber die Unsicherheit, dass, wie auch bei vielen Glykoproteinen, aufgrund struktureller Gegebenheiten nicht immer alle vorhandenen Glykosylierungsstellen genutzt werden. Deshalb wurde zusätzlich die Sensitivität des C-Terminus des Der1-HA Proteins gegenüber Proteasen untersucht.

Dazu wurden aus dem Stamm YRH145 (*DER1-HA DFMI-3HA*) intakte Mikrosomen isoliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen Proteinase K behandelt. Zytosolische Proteindomänen, wie z. B. die RING-H2-Finger-Domäne des Proteins Der3 (Deak und Wolf, 2001; Gardner *et al.*, 2000), werden von der Protease proteolytisch abgebaut (Abbildung 16B, vergleiche Spur 2 mit 3 und 5). Proteine, die durch die Mikrosomen-Membran

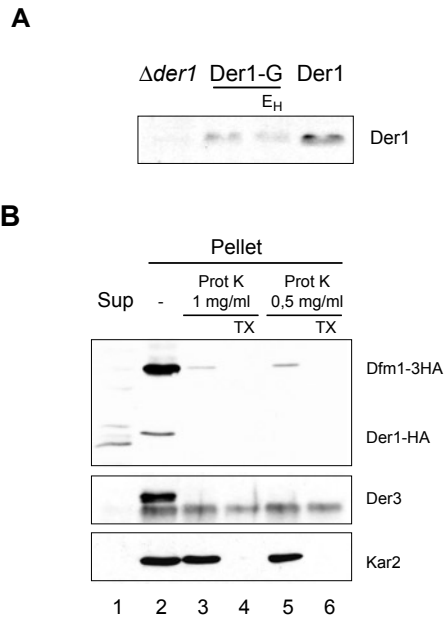


Abbildung 16: **Der Carboxyterminus von Der1 ist im Zytosol lokalisiert.** (A) Überexpression von Der1-G (pHIT135) und Der1 (pRS425*DER1*) in W303-CD. Die Behandlung mit Endoglykosidase H erfolgte eine Stunde bei 37 °C. Die Immunologische Detektion im Western Blot erfolgte mit Der1 spezifischen Antikörpern. (B) Intakte Mikrosomen des Stamms W303-1C *DER1-HA DFM1-3HA::KAN^R* (YRH145) wurden bei 0 °C für 30 min mit Proteinase K alleine, bzw. mit Proteinase K und Detergenz (1 % v/v Triton X-100), behandelt. Der Nachweis der Proteine Der1-HA und Dfm1-3HA erfolgte mit α HA, der von Der3 und Kar2 mit den jeweiligen polyklonalen Antikörpern.

geschützt sind, wie z. B. Kar2, können von der Protease nicht abgebaut werden (Abbildung 16B, vergleiche Spur 2 mit 3 und 5). Die Zugabe des Detergenz Triton X-100 zerstört die schützende Membran, sodass nun alle Proteine der Protease zugänglich sind (Abbildung 16B, vergleiche Spur 3 und 5 mit 4 und 6). Da das C-terminale HA-Epitop von Der1-HA durch Proteinase K zerstört wird, befindet sich der Carboxyterminus im Zytosol.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so stellt Der1 ein Membranprotein mit vier Transmembransegmenten sowie zytosolischen N- und C-Termini (Abbildung 17) dar.

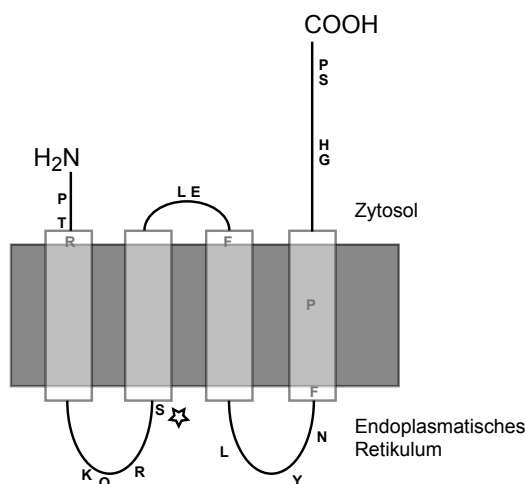


Abbildung 17: **Modell von Der1.** Angegeben sind konservierte Aminosäuren und deren Position in Der1 homologen Proteinen (siehe Kapitel „Datenbanksuche nach zu Der1 homologen Proteinen“). Das Sternchen kennzeichnet die Lage der Mutation im *der1-2* Allel (S59L). Die vier Transmembransegmente wurden auf Grundlage der Kyte-Doolittle Hydrophobizität (siehe Abbildung 12) positioniert.

Biologische Aktivität modifizierter Der1 Proteine

Lange Zeit war es unerklärlich, warum Mutanten mit starken Defekten in der ER assoziierten Degradation, wie z. B. $\Delta der1$, $\Delta der3$ oder $\Delta hrd3$ Nullmutanten, keine offensichtlichen Phänotypen (z. B. im Wachstum) besitzen. Die Arbeiten von Casagrande *et al.* (2000), Friedländer *et al.* (2000), Ng *et al.* (2000) und Travers *et al.* (2000) konnten dieses Rätsel lösen, indem sie zeigten, dass ERAD und UPR („unfolded protein response“) eng gekoppelte, sich gegenseitig kompensierende Prozesse sind. Beim gleichzeitigen Abschalten beider Systeme wird durch zusätzlichen Stress das Wachstum beeinträchtigt. Das gilt z. B. auch für $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelmutanten. Die unspezifische Stressinduktion durch Temperaturerhöhung führt zu konditionaler Letalität bei 37°C (Abbildung 18 und Travers *et al.*, 2000). Da haploide $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelmutanten bei restriktiver Temperatur zur Bildung von Suppressor-Kolonien neigten, wurden alle weiteren Untersuchungen mit homozygot diploiden Doppelmutanten (YRH110) durchgeführt.

Die konditionale Letalität von $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelmutanten wurde unter anderem zur Prüfung der biologischen Aktivität von modifizierten Der1 Proteinen verwendet. Am Beispiel der biologisch funktionellen Genprodukte der Plasmide pRS425DER1 und pRS425DER1-HA (Knop *et al.*, 1996a) ist zu sehen, dass beide Proteine das Wachstum der $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelmutante bei 37 °C erlauben, während das leere Plasmid kein Wachstum ermöglicht (Abbildung 18). Plasmidkodierte Überexpression der Proteine Der1 und Der1-HA komplementiert also die $\Delta der1$ Nullmutation in $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelmutanten bei 37 °C und verdeutlicht, dass Der1-HA biologisch aktiv ist.



Abbildung 18: **Genetische Interaktion von Der1 und Ire1.** Wachstum von diploiden W303-1C $\Delta ire1 \Delta der1$ Doppelmutanten (YRH110) mit leerem Plasmid oder plasmidkodierten Proteinen Der1 bzw. Der1-HA bei 25 °C und 37°C auf CM -Leucin Medium (3 Tage). Während die Doppelmutante mit leerem Vektor konditional letal ist, stellt die Überexpression von Der1 oder Der1-HA das Wachstum bei 37 °C wieder her.

Zusätzlich kann die biologische Aktivität von Der1 Fusionsproteinen auch durch Expression in einer $\Delta der1$ Nullmutante und anschließender Messung der Abbaukinetik von CPY* bestimmt werden. Wie aus Abbildung 19B und 19C hervorgeht, erlaubt die plasmidkodierte Expression des Fusionsproteins Der1-IRS in der $\Delta der1$ Nullmutante den Abbau von CPY*. Im Gegensatz

dazu ist das, mit einem 3-fach HA-Epitop am Aminotermius, markierte Protein 3HA-Der1 inaktiv.

Fasst man die Ergebnisse der Wachstumstests und des CPY* Abbaus mit Der1 Fusionsproteinen zusammen, ergibt sich folgendes Bild:

Nur Der1 Proteine mit kleinen Modifikationen am C-Terminus bleiben biologisch aktiv: Der1-HA (9 AS HA-Epitop, Abbildung 18), Der1-G (pHIT135, Abbildung 19) und Der1-IRS (5 AS IRS-Epitop; Abbildung 19). Wird die Veränderung am C-Terminus größer, verliert das Protein an Funktionalität: z. B. Der1-2HA (Knop *et al.*, 1996a). Modifikationen am N-Terminus von Der1 wirken sich noch drastischer aus: Schon kleine Veränderungen, wie das Einfügen des HA-Epitops in HA-Der1 (Knop *et al.*, 1996a) oder auch des 3-fach HA-Epitops in 3HA-Der1 (pHIT109; Abbildung 19) inaktivieren das markierte Protein. Auch die hydrophilen, zwischen den Transmembrandomänen von Der1 liegenden Bereiche, sind sensibel gegenüber Veränderungen. So führt z. B. die Insertion der Suc2A Reporterproteine, zur Bestimmung der Topologie von Der1 (pHIT124, 125 und 126, siehe Kapitel „Orientierung hydrophiler Der1 Segmente“), zu nicht funktionellen Der1 Proteinen (nicht gezeigt).

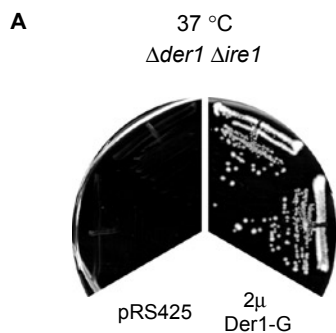
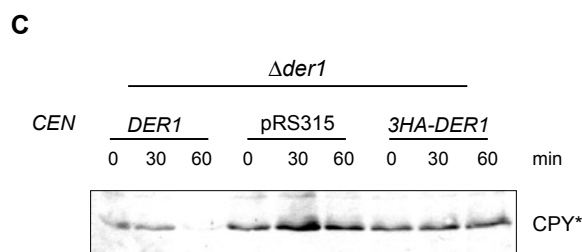
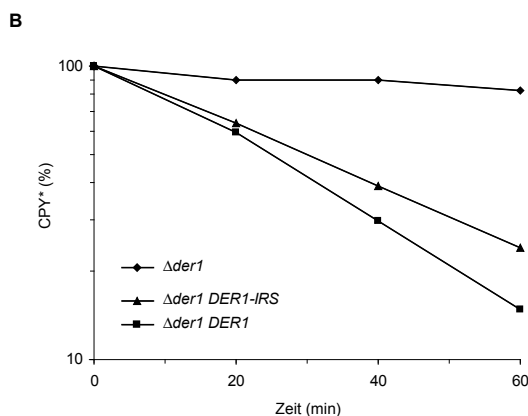


Abbildung 19: **Biologische Aktivität epitopmarkierter Der1 Proteine.**

(A) Plasmidkodierte Überexpression von Der1 mit einer zusätzlichen carboxyterminalen N-Glykosylierungs Konsensussequenz (Der1-G, pHIT135) führt zum Wachstum temperatursensitiver diploider W303-1C $\Delta ire1 \Delta der1$ Doppelmutanten (YR110) bei 37 °C auf CM -Leucin Medium (3 Tage). (B) Die Expression der Proteine Der1 (pRS315DER1) und Der1-IRS (pHIT118) stellt den Abbau in W303-CD ($\Delta der1$) wieder her. Die Abbaukinetik von CPY* wurde mit Pulse Chase Analyse in logarithmisch wachsenden Zellen bei 30 °C gemessen. (C) Aminotermiale Eptipomarkierung von Der1 mit einem 3-fach HA Epitop (pHI109) inaktiviert das Protein. Spätlogarithmische Kulturen von pRS315, pRS315DER1 und pHIT109 Plasmid tragender W303-CD ($\Delta der1$) Stämme wurden zum Zeitpunkt 0 min mit Cycloheximid versetzt und der CPY* Abbau über 60 min verfolgt. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit α CPY Antikörpern.



Suche nach Bindungspartnern von Der1

Wie in Abbildung 18 gezeigt, sind $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelmutanten konditional letal. Es stellte sich nun die Frage, ob dies ebenso für die Kombination der Mutantallele *der1-1* und *der1-2* mit einer $\Delta ire1$ Nullmutante gilt. Sollte dies der Fall sein, so könnte dieser Phänotyp dazu dienen, mit Der1 interagierende Proteine zu finden. Die Überexpression von noch unbekanntem Der1 Bindungspartnern könnte die Funktion mutierter Der1 Proteine der *der1-1* und *der1-2* Allele wiederherstellen und dadurch die konditionale Letalität dieser Stämme bei erhöhtem Stresspegel wieder aufheben. Infolge dessen wäre es möglich Der1 Bindungspartner zu identifizieren und damit weitere Erkenntnisse zur biologischen Funktion von Der1 zu erhalten.

Sequenzierung der Allele *der1-1* und *der1-2*

Aus der Mutagenese von A. Finger (1994) wurden unter anderem die zur selben Komplementationsgruppe gehörenden, mutierten Allele *der1-1* und *der1-2* erhalten. Das *der1-2* Allel besaß dabei einen stärkeren Einfluss auf den Abbau der ERAD Substrate CPY* und PrA*. Es wurde deshalb zur Klonierung von Der1 benutzt (Knop *et al.*, 1996a).

Um zu erfahren welche Mutationen in *der1-1* und *der1-2* vorliegen, wurden die *der1* Genloci beider Mutanten sequenziert. Dazu wurden beide Allele durch homologe Rekombination („gap repair“) aus dem Genom der Hefestämme YFI11 und YFI115 gewonnen. In den erhaltenen Plasmiden pRS315*der1-1* und pRS315*der1-2* wurde dann der *der1* Genlokus sequenziert. Dabei wurde festgestellt, dass die Basenabfolge von *DER1* im YAF6 und im S288C Stammhintergrund identisch ist (siehe Anhang „Sequenzierung von *der1-1* und *der1-2*“).

Beim Vergleich der *der1* Allele mit der aus der SGD-Datenbank erhaltenen *DER1* Sequenz (SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces), wurde im *der1-1* Allel keine Mutationen innerhalb des *DER1* Gens festgestellt (siehe Anhang „Sequenzierung von *der1-1* und *der1-2*“). Möglicherweise liegen hier Mutationen im Bereich des Promotors oder Terminators von *DER1* vor, die *in vivo* zu einer geringeren Menge an Der1 Protein wegen z. B. reduzierter Transkription oder instabiler mRNA führen. Damit wäre auch der geringere Einfluss der *der1-1* Mutante auf den Abbau von CPY* und PrA* erklärbar (Knop, 1996). Im

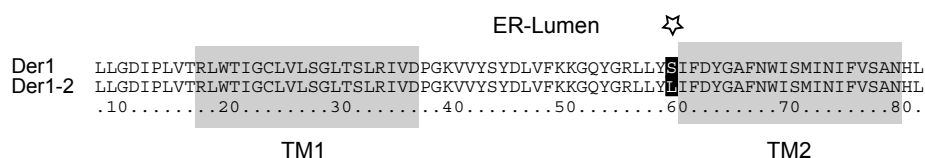


Abbildung 20: Eine Punktmutation im *der1-2* Allel führt zu einem Austausch von Serin durch Leucin in der Aminosäuresequenz von Der1. Vergleich der Sequenzen von Der1 und Der1-2 im Bereich der Mutation. Das Sternchen kennzeichnet den Serin zu Leucin (S59L) Aminosäureaustausch im *der1-2* Allel. Die grauen Boxen geben die ungefähre Lage der Transmembrandomänen TM1 und TM2 an (siehe Abbildung 12).

der1-2 Allel hingegen, konnte eine einzelne Punktmutation identifiziert werden (Abbildung 20). Sie führt zu einem Austausch der Aminosäure Serin zu Leucin an der Position 59 in Der1 (S59L). Damit liegt die Mutation im ersten ER-luminalen Segment, in der Nähe der zweiten Transmembrandomäne (TM2).

Temperatursensitivität von *der1-2 Δire1* Doppelmutanten

Damit mit isogenen Stammhintergründen gearbeitet werden kann, wurde das Mutantenallel *der1-2* in den W303 Stammhintergrund eingebracht. Zusätzlich wurde noch GFP (grün fluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle des *MET25* Promotors eingeführt. Damit kann durch Induktion der GFP Expression die Effizienz der Proteintranslation in Hefezellen anhand ihrer zytosolischen Fluoreszenzintensität überprüft werden. Der so erzeugte Stamm YRH106 (*der1-2 Δire1 P_{MET25}-GFP*) erwies sich ebenso wie die Δ *der1 Δire1* Doppelmutanten konditional letal (Abbildung 21). Da haploide *der1-2 Δire1* Doppelmutanten bei restriktiver Temperatur zur Bildung von Suppressor Kolonien neigten, wurden alle Untersuchungen mit homozygot diploiden Mutanten (YRH107) durchgeführt.

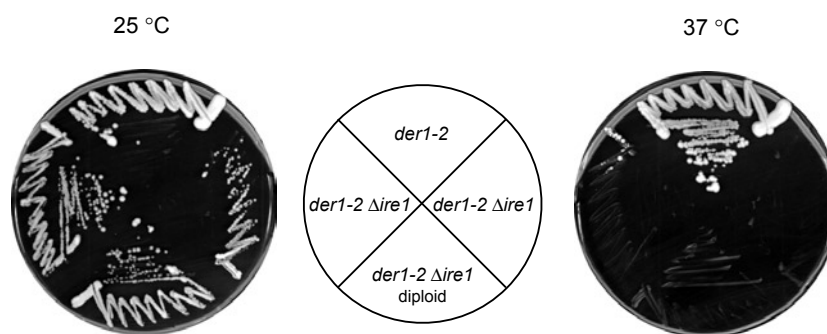


Abbildung 21: ***Der1-2 Δire1* Doppelmutanten sind konditional letal.** Wachstum der Stämme W303-1C *der1-2 Δire1 P_{MET25}-GFP* (YRH106) und homozygot diploidem W303-1C *der1-2 Δire1 P_{MET25}-GFP* (YRH107) im Vergleich zum isogenen Wildtyp (W303-1C *der1-2 P_{MET25}-GFP*) auf YPD bei 25 °C und 37 °C (2 Tage).

Suppression der Temperatursensitivität von *der1-2 Δire1* Mutanten

Die homozygot diploide Hefe YRH107 (W303-1C *der1-2 Δire1 GFP*) wurde nun verwendet, um Genprodukte zu finden, welche bei Überexpression spezifisch den Defekt des *der1-2* Allels unterdrücken und dadurch die konditionale Letalität der *der1-2 Δire1* Doppelmutante aufheben (High-Copy-Suppressoren).

Um Suppressoren zu erhalten, die bei Überexpression das Wachstum der *der1-2 Δire1* Doppelmutante bei erhöhter Temperatur (37 °C) ermöglichen, wurde der homozygot diploide Stamm YRH107 (*der1-2 Δire1 P_{MET25}-GFP*) mit einer YEp13 Genbank (K. Nasmyth; durchschnittliche Größe des DNA-Inserts ist ca. 6 kb) transformiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 25 °C auf CM -Leucin Selektionsmedium wurden die 30000 erhaltenen Transformanten

replika-plattiert und weitere drei Tage bei 37 °C kultiviert. Wachsende Kandidaten wurden auf Einzelkolonien ausgestrichen und ihr Wachstum bei 37 °C erneut überprüft. Aus den so erhaltenen 100 Suppressor-Kandidaten wurde das enthaltene Genbankplasmid isoliert. Mittels PCR (Oligonukleotide: *der1* prom, *der1* term, *ire1* fwd, *ire1* rev) konnten 11 Plasmide identifiziert werden, die das *DER1* oder *IRE1* Gen im DNA-Insert enthielten. Aus den übrigen Genbankplasmiden wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung der genomischen DNA-Fragmente (Oligonukleotide: YEp13 BamHI fwd, YEp13 BamHI rev), diejenigen mit identischen genomischen Inserts ausgesondert. Die verbliebenen 36 Plasmide enthielten unterschiedliche DNA-Inserts. Sie wurden erneut in den Stamm YRH107 transformiert und ihr Wachstum bei 37 °C überprüft. Letztlich konnten 19 Suppressor-Kandidaten isoliert werden, die das Wachstum des Stamms YRH107 bei 37 °C wieder ermöglichten (Abbildung 22A und Tabelle 1).

Im nächsten Schritt wurden jetzt aus den 19 erhaltenen Suppressor-Plasmiden diejenigen ermittelt, deren Suppression auf eine Wechselwirkung mit dem *der1-2* Allel zurückzuführen ist. Sie sollten deshalb zwei weitere Kriterien erfüllen: i) Erhaltung der Temperatursensitivität von $\Delta*der1* \Delta*ire1*$ Doppelmutanten und ii) Reduzierung der Halbwertszeit des CPY* Abbaus in *der1-2* Mutanten.

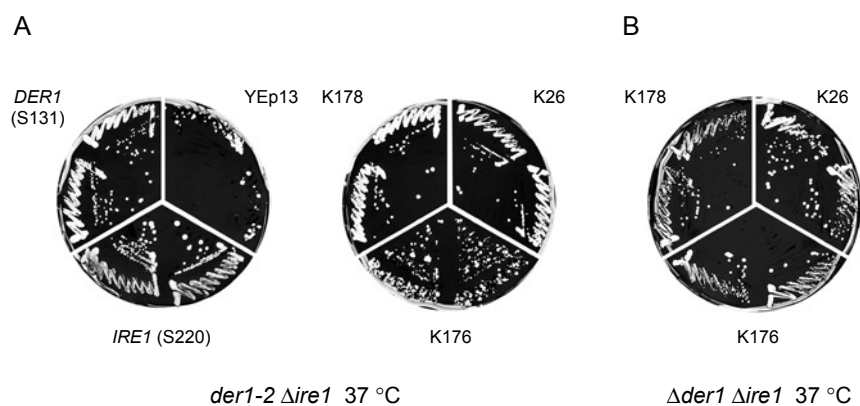


Abbildung 22: Überexpressions-Suppressoren heben die Letalität von *der1-2 Δire1* und $\Delta*der1* \Delta*ire1*$ Doppelmutanten auf. Es wurden jeweils zwei unabhängige Kolonien einer Transformation ausgestrichen. (A) Am Beispiel der isolierten Genbankplasmide K26, K176 und K178 ist zu sehen, dass die Überexpression dieser Suppressoren das Wachstum von W303-1C *der1-2 Δire1* Doppelmutanten (YRH107) bei 37 °C wiederherstellen (CM -Leucin Medium, 3 Tage). Zum Vergleich sind Doppelmutanten gezeigt, die das leere Plasmid YEp13 oder für *Der1* (S131) bzw. für *Ire1* (S220) kodierende Genbankplasmide tragen. (B) Die Genbankplasmide K26, K176 und K178 ermöglichen ebenso das Wachstum von W303-1C $\Delta*der1* \Delta*ire1*$ Stämmen (YRH110) bei 37 °C (CM -Leucin Medium, 3 Tage).

Zur Überprüfung des ersten Kriteriums wurden homozygot diploide $\Delta*der1* \Delta*ire1*$ Doppelmutanten (YRH110) mit den 19 Kandidaten transformiert und bei 37 °C inkubiert. Interessanterweise, erlaubten jedoch alle isolierten Genbankplasmide auch das Wachstum von $\Delta*der1* \Delta*ire1*$ Mutanten bei erhöhter Temperatur, wie in Abbildung 22B am Beispiel der Kandidaten K26, K176 und K178 zu sehen ist (siehe auch Tabelle 1). Die zweite Bedingung,

Klon	Häufigkeit	Chrom.	Genbankinsert (abgeschätzt)	Wachstum bei 37 °C	
				<i>der1-2 Δire1</i>	<i>Δder1 Δire1</i>
K 15	3	08	'YHL035C, SBP1, RPL8A, GUT1'	+	+
K 18	1	11	'SFT1, RPL14A, YKL005C, AUR1'	+	+ (o)
K 20	1	12	YLR173W, IDP2, CBF5, RFX1	+	+
K 26	5	12	'NMT1, PWP1, SIK1, YLR198C, YLR199C'	+	+
K 67	1	12	'HOG1, tR (ACG)L, EFR4	+	+
K 81	11	10	'VPS53, YJL028W, EMT5, RNR2, RRN7'	+	+
K 99	1	05	'POL5, RPL12A, MAK10, AFG1'	+	+
K 114	3	14	'APC1, YNL171C, YNL170W, PSD1, YNL168C, SKO1'	o	o (-)
K 117	11	13	CMP2, IMD4, SNR54, SPC2	+	+
K 122	1	15	DCI1, LAS17, RPS30B, FYV12, SER1'	+	+
K 150	2	14	'ANL008C, SIS1, LST8, MRP7, HRB1'	+	+
K 176	3	14	WSC2, POP3, HCH1, ERG24'	o	+
K 178	2	10	CCT7, GZF3, YJL109C'	+	+
K 183	1	10	'YJL149W, SNR128/190, RPA34, YJL147C, IDS2'	o	o
K 204	1	03	YCRWdelta10, YCR018C-A, MAK32, PET18, MAK31, HTL1, HSP30, YCR022C'	o	o
K 249	3	14	PCL1, SNR40, CAF40, SEC21	+	+
S 117	1	10	ABM1, CPA2, YJR110W (...YJR107W)	+	+
S 130	1	3	PDI1, YCL041C, YCL042W, GLK1, YCL039W'	+	+
S 151	2	06	RIM15, YFL032W, HAC1, YFL030W, CAK1, CAF16'	+	o
S 131		02	DER1	++	+++
S 220		08	(...YHR076W...) NMD2, YHR078W, IRE1'	+++	+++

Tabelle 1: **Übersicht über die aus dem Suppressor Screen isolierten Kandidaten-Gene.** Angegeben ist die Häufigkeit ihres Auftretens und der zum Genbankfragment gehörende genomische Ausschnitt (Sequenziert mit den Oligonukleotiden YEp13 BamHI fwd und YEp13 BamHI rev). Einige chromosomale Fragmente wurden nur aus einer Richtung sequenziert. Die Fragmentgröße wurde dann mittels Restriktionsverdau abgeschätzt. Unvollständige vorhandene Genloci sind durch einen Apostroph (') gekennzeichnet. Zusätzlich ist das Wachstum von *der1-2 Δire1* (YRH107) bzw. *Δder1 Δire1* (YRH110) Doppelmutanten nach Transformation mit dem entsprechenden Genbankplasmid angeführt: (+++) sehr gutes, (++) gutes, (o) schlechtes, (-) kein Wachstum.

erneuter CPY* Abbau in Genbankplasmid tragenden W303-1C *der1-2* Stämmen, wurde mit Cycloheximid Chase Analyse untersucht (Abbildung 23). Es konnte kein Suppressor gefunden werden, der die Wiederherstellung des CPY* Abbaus bewirkte.

Da keiner der isolierten Suppressoren die obigen Anforderungen erfüllte, wurde eine detailliertere Untersuchung der Genbankplasmide nicht mehr durchgeführt.

Parallel zur beschriebenen Suche nach Genbanksuppressoren wurden auch gezielt Proteine im Stamm YRH107 (*der1-2 Δire1*) überexprimiert und anschließend das Wachstum bei 37 °C untersucht. Dafür wurden 2μ Plasmide verwendet, die folgende Gene tragen: *DER3*, *HTM1*, *HRD3*, *KAR2*, *LHS1*, *SEC61*, *SEC63* und *UFD1*. Jedoch konnte keines der Plasmide das Wachstum des *der1-2 Δire1* Mutanten bei 37 °C ermöglichen (nicht gezeigt).

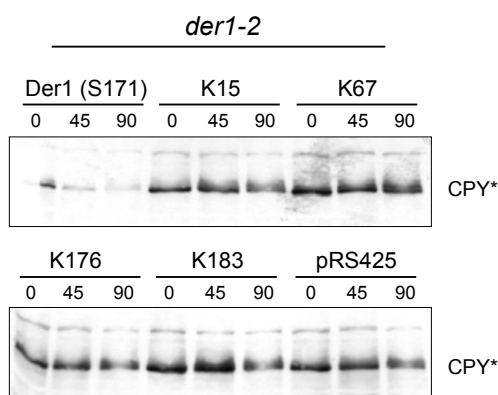


Abbildung 23: Die isolierten Suppressoren bewirken keinen Abbau von CPY* in *der1-2* Punktmutanten. Die Genbankplasmide wurden in W303-1C *der1-2* (YRH153) transformiert. In spätlogarithmischen Zellen (30 °C) wurde dann, nach Stoppen der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid (Zeitpunkt 0 min), über 90 min der CPY* Abbau verfolgt. Beispielhaft sind die Suppressoren K15, K67, K176 und K183 gezeigt. Als Vergleich dienten das *DER1* enthaltende Genbankplasmid S171 und das leere Plasmid pRS425. Der Nachweis im SDS-PAGE erfolgte mit α CPY Antikörpern.

Datenbanksuche nach zu Der1 homologen Proteinen

Die fortschreitende Sequenzierung von Genomen und die vereinfachte Proteom Analyse unterschiedlichster Organismen führen zu einer stetig steigenden Zahl elektronischer Genom- und Proteindatenbanken. Suchmaschinen wie z. B. BLAST (Altschul *et al.*, 1997) durchsuchen diese Datenbanken und erlauben es – ohne aufwendige Biochemie – homologe Proteine oder konservierte Proteindomänen in einer Vielzahl von Organismen aufzuspüren. Wird dabei ein homologes Protein mit bekannter Funktion identifiziert, ermöglicht dies oft erste Rückschlüsse auf die biologische Rolle des Zielproteins.

Mit einem Protein aus *Hansenula polymorpha* war schon ein zu Der1 orthologes Protein bekannt (Knop *et al.*, 1996a). Inzwischen sind mindestens 15 Proteine, die zur Familie der „Der1-ähnlichen“ (Domäne PF04511; Pfam, Sanger Institute; www.sanger.ac.uk) gezählt werden, bekannt. Die Bandbreite reicht dabei vom Mensch (*Homo sapiens*), über das Hefeprotein Ydr411c in *Saccharomyces cerevisiae* bis hin zur Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 24). Eine Datenbanksuche mit BlastP (Schweizerisches Institut für Bioinformatik (SIB), BLAST Network Service; Altschul *et al.*, 1997) ergab sogar über 20 zu Der1 homologe Proteine bzw. Proteinsegmente (siehe Anhang „BlastP“). Obwohl die Größe vieler orthologer Proteine mit der von Der1 vergleichbar ist – meist im Bereich 200-300 Aminosäuren – ist

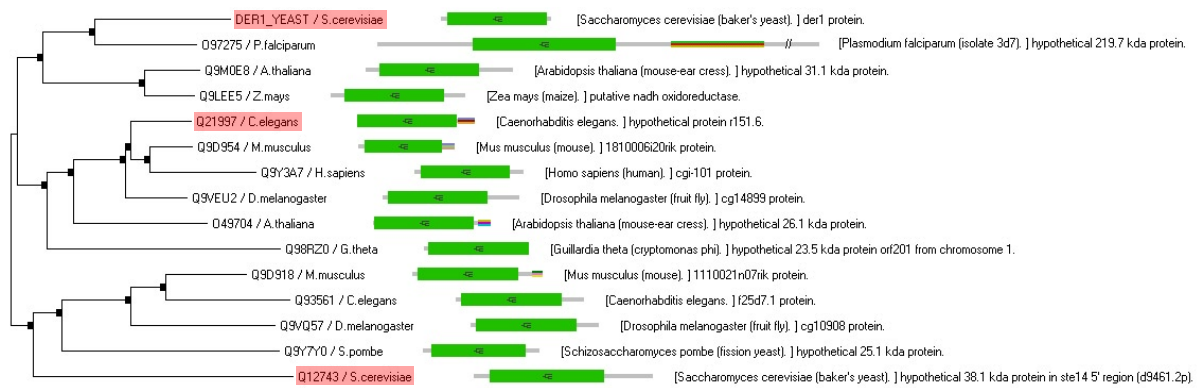


Abbildung 24: **Proteine der „Der1-ähnlichen“ Familie.** Domänen Organisation dargestellt mit NIFAS v3.0 (Domäne PF04511; Pfam, Sanger Institute; www.sanger.ac.uk).

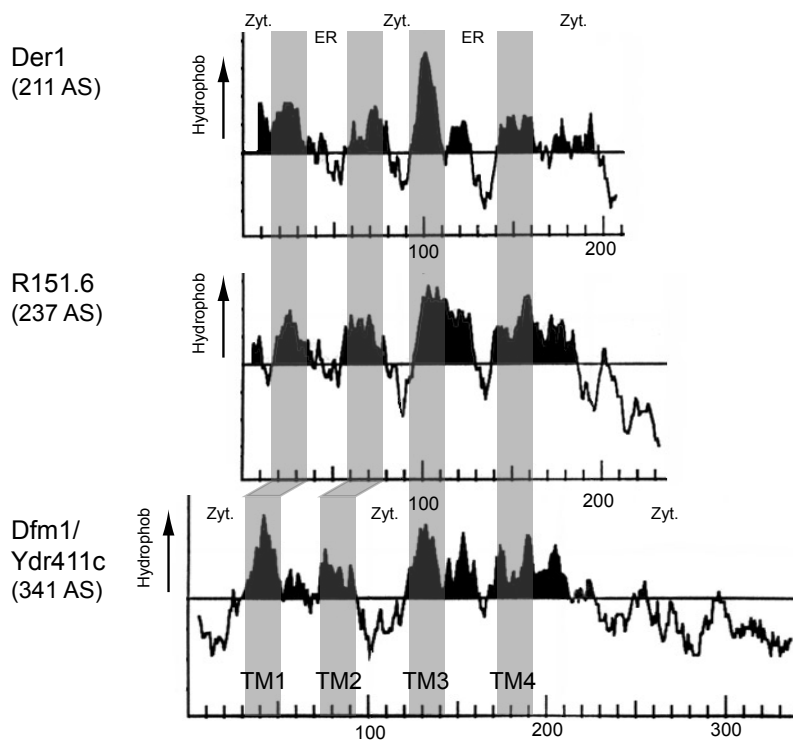


Abbildung 25: **Proteinen der „Der1-ähnlichen“ Familie besitzen große strukturelle Ähnlichkeit.** Kyte-Doolittle Hydrophatit Blots (DNA Strider v1.2) der homologen Proteine Der1 (*S. cerevisiae*), R151.6 (*C. elegans*) und Dfm1 (*S. cerevisiae*). Die Lage der Transmembrandomänen (graue Boxen) und die Lokalisierung der hydrophilen Bereiche (ER: ER-luminal; Zyt.: zytosolisch) ist angegeben. Die Diagramme wurden an der dritten Transmembrandomäne (TM3) ausgerichtet.

die Sequenzhomologie relativ schwach ausgeprägt (Identität bis ca. 25 %, Ähnlichkeit bis ca. 50 %). Konservierte Aminosäuren sind dabei hauptsächlich in den hydrophilen Proteinanteilen enthalten (siehe Anhang „Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine“). Die Ähnlichkeit der Mitglieder der Familie „Der1-ähnlich“ wird deutlicher, wenn man ihre Kyte-Doolittle Hydrophatit Blots vergleicht (Abbildung 25). Die Anzahl, die Lage und der Abstand von Transmembrandomänen sind in den Orthologen vergleichbar.

In den folgenden Abschnitten wird auf zwei Proteine der Familie „Der1-ähnlich“ näher eingegangen: Das Protein Ydr411c aus *S. cerevisiae* und das *C. elegans* Protein R151.6.

Ydr411c/Dfm1 gehört zur Familie „Der1-ähnlicher“ Proteine

Der ORF *YDR411c* kodiert für ein 38 kDa großes Membranprotein unbekannter biologischer Funktion und zellulärer Lokalisierung (YPD™, Incyte Genomics Inc.; www.incyte.com). Die Transkription von *YDR411c* wird, wie die von *DER1*, sehr stark durch ER-Stress reguliert (Travers *et al.*, 2000). Aufgrund seiner Zugehörigkeit zur Familie der „Der1-ähnlichen“ Proteine wird es im weiteren Verlauf als Dfm1 (Der1-like family member) bezeichnet.

Mit 341 Aminosäuren ist Dfm1 einer der größten Vertreter der Familie „Der1-ähnlicher“ Proteine. Das Genprodukt von *DFM1* ist zu 23 % identisch mit Der1 und enthält die konservierten Aminosäuren der orthologen Der1 Proteine (siehe Anhang „Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine“). Eine Kyte-Doolittle Analyse des Proteins Dfm1 schlägt, wie für Der1, vier Transmembrandomänen vor (Abbildung 25). Legt man deshalb Dfm1 eine zu Der1 analoge Topologie zugrunde, fällt auf, dass alle zytosolischen Bereiche Erweiterungen in der Polypeptidkette tragen. Speziell der C-Terminus ist um ca. 75 Aminosäuren verlängert.

In den folgenden Abschnitten wird das Protein Dfm1 charakterisiert und auf eine Beteiligung an der ERAD untersucht.

Computergestützte Analyse des Carboxyterminus von Dfm1

Die detailliertere Betrachtung des verlängerten C-Terminus von Dfm1 mit WU-Blast2 (SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces), offenbart ein sich wiederholendes Aminosäuremuster FxGRGQRbG (x: beliebige AS; b: basische AS). In abgewandelter Form ist es ebenfalls in den orthologen Proteinen Q9M0E8 (*A. thaliana*) und Q9LEE5 (*Zea mays*) vorhanden (siehe Anhang „Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine“).

A

Sequence Name	Hit Number	Matching Pattern	Matching Positions		Matching Result	Locus Information
			Begin	End		
YDR411C	2	FSGRGQRL	284	291	Sequence	Hypothetical ORF
		FOGRGORV	324	331	Sequence	
YBL058W/SHP1	1	FSGQGQRL	306	313	Sequence	putative regulatory subunit for Gic7p, a phosphatase required for glucose repression
YGR048W/UFD1	1	FVGQGNLI	258	265	Sequence	ubiquitin fusion degradation protein
YHR134W/WSS1	1	FLGNGQRL	152	159	Sequence	Weak suppressor of smt3 mutant
YKL107W	1	FPGNGQVG	155	162	Sequence	Hypothetical ORF
YNLI72W/APC1	1	FLGSGQYA	1505	1512	Sequence	subunit of ubiquitin- protein ligase

B



Abbildung 26: Ein im Carboxyterminus von Dfm1 vorhandenes Aminosäuremuster ist in weiteren Hefeproteinen enthalten. (A) Ergebnis der PatMatch Suche mit FxGzGQxb in Hefe (SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces). (B) Auszug des Alignments der Proteine Ufd1hs und p47 aus *H. sapiens*, mit Ufd1, Shp1 und Dfm1 aus *S. cerevisiae* (erstellt mit ClustalX 1.81, Thompson *et al.*, 1997). Sternchen (*) geben konservierte Aminosäuren an. Die Position weiterer Proteindomänen ist durch graue Boxen angedeutet (Pfam, Sanger Institute; www.sanger.ac.uk).

Um einen möglichen Hinweis auf die Funktion des Aminosäuremusters zu erhalten, wurde das Programm PatMatch verwendet (SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces). PatMatch ermöglicht die Identifizierung weitere Proteine mit ähnlichen Aminosäuremustern in der Hefe *S. cerevisiae*. Als Suchparameter wurde die verallgemeinerte Form FxGzGQxb (z: saure AS) benutzt. Als Ergebnis wurden fünf Proteine mit ähnlichen Aminosäuremustern gefunden (Abbildung 26). Vier Proteine werden mit Ubiquitin (Shp1, Ufd1, Apc1) bzw. Ubiquitin ähnlich (Wss1) regulierten Prozessen in Verbindung gebracht. Über die Funktion des fünften Proteins, Ykl107w, ist nichts bekannt. Im Protein Shp1 ist das Aminosäuremuster FxGzGQxb direkt vor der UBX Domäne lokalisiert (Abbildung 26B), die Funktion ist unbekannt.

Lokalisierung von Dfm1

Um Dfm1 biochemisch nachweisen zu können, wurde es C-terminal mit einem 3-fachen HA-Epitop versehen. Die anschließende Western-Analyse bestätigte das berechnete Molekulargewicht von ca. 43 kDa für das epitopmarkierte Dfm1-3HA Fusionsprotein (Abbildung 27). Die biologische Funktionalität wurde nicht untersucht.

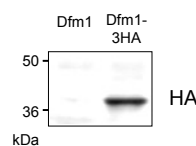
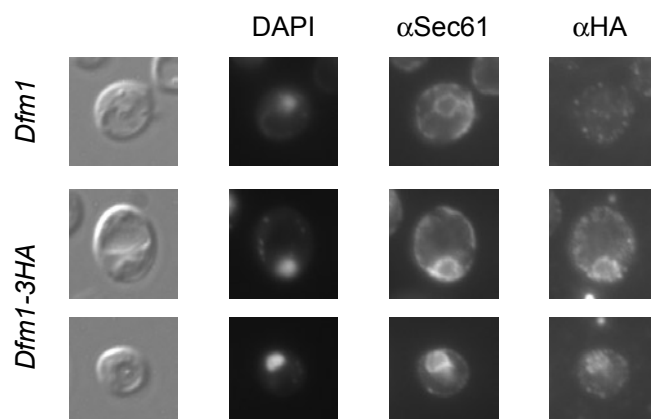


Abbildung 27: **Epitopmarkiertes Dfm1-3HA hat eine Größe von 43 kDa.** Western Blot Analyse von Membranextrakten frühstationärer W303- Δ D *DFM1-3HA* (YRH143) und W303-CtD Hefezellen. Zur Detektion von Dfm1-3HA wurde α HA Antikörper verwendet.

Anschließend wurde die zelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins Dfm1-3HA mittels indirekter Immunofluoreszenz bestimmt. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, kolokalisiert Dfm1-3HA mit Sec61. Beide Proteine zeigen eine, für ER Proteine typische, ringförmige Färbung um den Zellkern (Stirling *et al.*, 1992).

Abbildung 28: **Dfm1 kolokalisiert mit Sec61 in ER-typischen Strukturen.** Fixierte und permeabilisierte Zellen der Stämme W303- Δ D und W303- Δ D *DFM1-3HA* (YRH143) wurden gleichzeitig mit α HA und α Sec61 Antikörpern inkubiert. α HA wurde mit einem Cy3 konjugiertem Ziege-anti-Maus, α Sec61 mit einem FITC konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper sichtbar gemacht. Die Lokalisierung des Zellkerns wurde mit dem DNA färbenden Farbstoff DAPI visualisiert.



Orientierung des Carboxyterminus

Die Lokalisierung des C-Terminus von Dfm1-3HA wurde mit Hilfe von Protease-Verdau Experimenten bestimmt (siehe Kapitel „Bestimmung der Topologie von Der1“). Dazu wurden aus dem Stamm YRH145 (*DER1-HA Dfm1-3HA*) intakte Mikrosomen isoliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen Proteinase K behandelt. Wie aus Abbildung 16B hervorgeht, ist das Fusionsprotein in den mit Protease behandelten Proben kaum mehr nachweisbar (Abbildung 16B, Spur 2, 3 und 5). Da der epitopmarkierte C-Terminus von Dfm1-3HA, ebenso wie zytosolischen RING-Finger Domäne von Der3, durch Proteinase K abgebaut wird, ist er außerhalb der Mikrosomen-Membran, also im Zytosol lokalisiert. Die Integrität der Mikrosomen wurde durch die Detektion des ER-luminalen Proteins Kar2 bestätigt. Erst die Auflösung der Mikrosomen-Membran mit dem Detergenz Triton X-100 macht Kar2 der Protease zugänglich (Abbildung 16B, Spur 3 und 4, sowie 5 und 6).

Phänotypen der $\Delta dfm1$ Nullmutante

Zu einer weiteren Charakterisierung wurde eine $\Delta dfm1$ Nullmutante (YRH59) konstruiert. Dazu wurde der ORF von *DFM1* durch das *HIS5* Gen aus *S. kluyveri* ersetzt (Longtine *et al.*, 1998). Der anschließend durchgeführte Wachstumstest der Nullmutanten bei 25 °C bzw. 37 °C war unauffällig (nicht gezeigt).

Dfm1 und *Ire1* zeigen keine genetische Interaktion

Die Transkription von *DFM1* wird, ebenso wie die von *DER1*, in Abhängigkeit von ER-Stress reguliert (Travers *et al.*, 2000). Deshalb wurde untersucht, ob $\Delta dfm1 \Delta ire1$ Doppelmutanten (YRH66), ebenso wie $\Delta der1 \Delta ire1$ Stämme, Wachstumsdefekte bei erhöhter Temperatur aufweisen. Das Ergebnis des Wachstumstests ist in Abbildung 29 dargestellt. Das Wachstum der Doppelmutante ist auch bei 37 °C mit dem des Wildtyps vergleichbar.

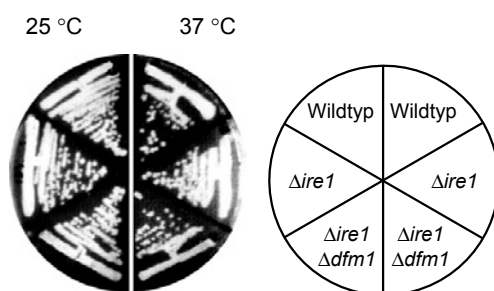


Abbildung 29: **Dfm1 zeigt keine genetische Interaktion mit Ire1.** Wachstum der isogenen Hefen W303-1C (WT), $\Delta ire1$ (YRH66) und $\Delta ire1 \Delta dfm1$ (YRH64) auf YPD bei 25 °C und 37 °C (2 Tage).

Abbau der ERAD Substrate Sec61-2 und CPY*

Im Folgenden wurde der Einfluss der $\Delta dfm1$ Nullmutante auf den Abbau der ERAD Substratproteine Sec61-2 und CPY* untersucht.

Eine Mutation der zentralen Translokonkomponente Sec61 führt im *sec61-2* Allel zur Temperatursensitivität. Diese Hefen sind bei 38 °C nicht mehr lebensfähig (Deshaies und Schekman, 1987). Es hat sich herausgestellt, dass das Protein Sec61-2 – wie CPY* – ebenfalls über die ER-assoziierte Degradation abgebaut wird und deshalb instabil ist. Entfernung der an ERAD beteiligten Proteine Ubc6, Ubc7, Der3/Hrd1 und Hrd3 verhindern den Abbau und heben dadurch die Temperatursensitivität dieser Hefestämme wieder auf (Biederer *et al.*, 1996; Bordallo *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1999).

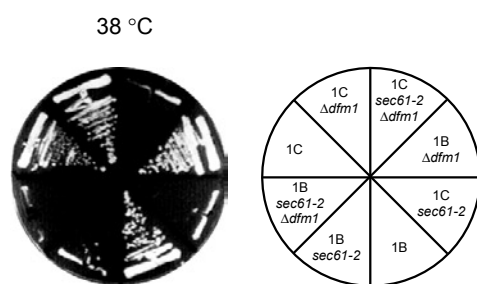


Abbildung 30: Dfm1 ist nicht am Abbau von Sec61-2 beteiligt. Wachstum von Sporen zweier Tetraden bei 38 °C auf YPD (2 Tage). Sie wurden aus einer Tetradendisektion eines heterozygot diploiden W303 *sec61-2/SEC61 DFM1/dfm1 prc1-1/PRC1* Stamms erhalten (1B: CPY bzw. *PRC1*; 1C: CPY* bzw. *prc1-1*).

Um herauszufinden, ob das Dfm1 Protein am Abbau des ERAD Substrats Sec61-2 beteiligt ist, wurde das Wachstum von *sec61-2 Δdfm1* Doppelmutanten untersucht. Wie in Abbildung 30 jedoch zu sehen ist, sind diese Doppelmutanten bei 38 °C nicht lebensfähig. Das Protein Dfm1 ist daher nicht am Abbau von Sec61-2 beteiligt.

Anschließend wurde die Kinetik des CPY* Abbaus in $\Delta dfm1$ Einzel- (YRH59) und $\Delta dfm1 \Delta der1$ (YRH86) Doppelmutante mit „Pulse Chase“ Analyse gemessen. Das Entfernen des Proteins Dfm1 wirkt sich nur äußerst schwach auf den Abbau von CPY* aus. Dies ist sowohl in der Gegenüberstellung von $\Delta dfm1$ Einzelmutante mit dem Wildtyp, wie auch im Vergleich des $\Delta der1 \Delta dfm1$ Stamms mit $\Delta der1$ Nullmutante, zu sehen (Abbildung 31).

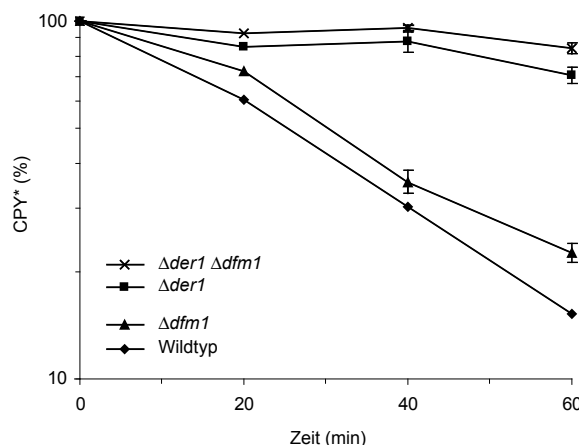


Abbildung 31: Dfm1 wird für einen effizienten Abbau von CPY* benötigt. Messung des CPY* Abbaus in W303-1C (Wildtyp), W303- ΔD ($\Delta der1$), W303-1C $\Delta dfm1$ (YRH59) und W303-1C $\Delta der1 \Delta dfm1$ (YRH86) bei 30 °C mit Pulse Chase Analyse. Die Balken bei 40 und 60 min geben die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten an.

Heterologe Expression des *C. elegans* Proteins R151.6 in Hefe

Ein weiteres zur Familie der „Der1-ähnlichen“ gehörendes Protein ist R151.6 aus *C. elegans*. Der für das Protein R151.6 kodierende Genlokus wurde als Teil eines sechs Gen Operons identifiziert. *R151.6* kodiert für ein 237 AS (28 kDa) großes Protein mit einer mutmaßlichen Funktion als NADH Oxidoreduktase Komplex I Untereinheit (Hough *et al.*, 1999). Das Protein ist schwach homolog zu Der1 und Dfm1 (ca. 25 % Identität), viel stärker homolog zu FLANA aus *M. Musculus* (67 %) und F-LAN-1 aus *H. Sapiens* (70 %) (YPD™, Incyte Genomics Inc.; www.incyte.com). Im Unterschied zum Protein Dfm1 ist die Membranstruktur von R151.6, dargestellt durch einen Kyte-Doolittle Hydrophatit Blot, jedoch nahezu identisch mit der des Der1 Proteins (Abbildung 25). Das Protein R151.6 ist der Vertreter der „Der1-ähnlichen“ Familie, welcher in seiner Aminosäureabfolge Der1 am nächsten kommt (siehe Anhang „Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine“).

Es wurde nun untersucht, ob das R151.6 Protein die Funktion von Der1 in der Hefe *S. cerevisiae* ersetzen kann. Dazu wurde ein *R151.6* cDNA tragendes Plasmid in YRH110 ($\Delta der1 \Delta ire1$) transformiert und anschließend das Wachstum dieses Stamms bei erhöhter Temperatur getestet. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, führt die Überexpression von R151.6 (pHIT134) zu lebensfähigen Hefen. Das heißt, das *C. elegans* Protein R151.6 ist in der Lage die Rolle von Der1 in Hefe zumindest teilweise zu übernehmen. Die Funktion von Der1 ist demnach bis hin zu höheren Eukaryonten konserviert.

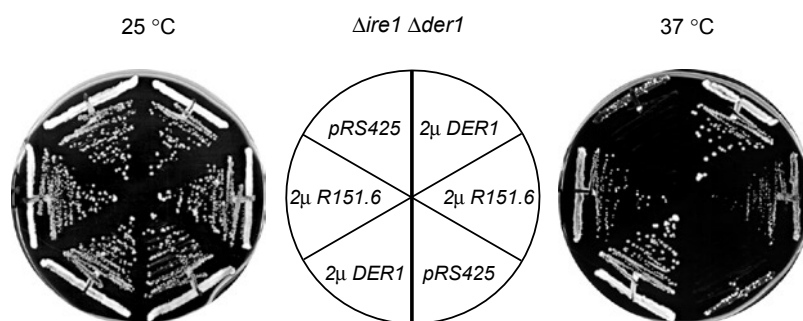


Abbildung 32: Die heterologe Expression von R151.6 aus *C. elegans* hebt die konditionale Letalität von $\Delta der1 \Delta ire1$ Doppelnullmutanten auf. Wachstum von diploiden $\Delta ire1 \Delta der1$ Doppelmutanten (YRH110) mit leerem Plasmid (pRS425), pRS425 $DER1$ oder pRS425 P_{DER1} -R151.6- T_{DER1} (pHIT134) auf CM -Leucin Platten bei 25 °C und 37 °C (3 Tage). Es wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Transformanten untersucht.

Einfluss von zytosolischen Chaperonen auf die Degradation von CPY*

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass zytosolische Chaperone der Hsp70 und Hsp90 Familie zum proteasomalen Abbau der Membranproteine CFTR, Apoprotein B und mutierter Insulinrezeptor notwendig sind (Gusarova *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 1998;

Zhang *et al.*, 2001). Für lösliches CPY* dagegen konnte keine Beteiligung zytosolischer Hsp70 Chaperone der Ssa-Familie und dem mit Hsp70 assoziierten DnaJ Protein Ydj1 (Hsp40) nachgewiesen werden (Deak, 2001). Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit der Einfluss weiterer zytosolischer Chaperone und der einiger Chaperon-Kofaktoren, auf den Abbau von CPY* untersucht werden.

Ausgewählt wurden die homologen Proteine Hsc82 und Hsp82 der Hefe Hsp90 Familie und deren Kofaktoren Sti1 und Sba1 (Chang *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998). Diese Proteine wechselwirken unter anderem mit Signaltransduktionsmolekülen und regulieren dabei deren Stabilität (Höhfeld *et al.*, 2001; Nollen und Morimoto, 2002). Des Weiteren wurde das Chaperon Hsp104 der Hsp100/Clp Familie untersucht. Es ist, zusammen mit zytosolischen Hsp70 Chaperonen, an der Reaktivierung von hitzedenaturierten oder aggregierten Proteinen beteiligt (Glover und Lindquist, 1998; Hänninen *et al.*, 1999).

Abbau des ERAD Substrats CPY*

Die Degradation des ERAD Substrats CPY* wurde mit „Pulse Chase“ Analyse in den Stämmen $\Delta hsc82$, $\Delta hsp82$, $\Delta sti1$, $\Delta sba1$ und $\Delta hsp104$ untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Während CPY* in den Mutanten $\Delta hsp82$ und $\Delta hsp104$ gleichschnell wie im Wildtyp abgebaut wird, ist in der $\Delta hsc82$ Nullmutante ein verzögerter Degradationsstart zu beobachten. Dieses verzögerte „anspringen“ des Abbaus ist ebenso, wenn auch in kleinerem Ausmaß, in $\Delta sti1$ und $\Delta sba1$ Deletionsmutanten sichtbar. Zu späteren Zeitpunkten ist jedoch in allen drei Mutanten die Abbaugeschwindigkeit mit der im Wildtyp vergleichbar (sichtbar am parallel verschobenen Verlauf der Kinetik).

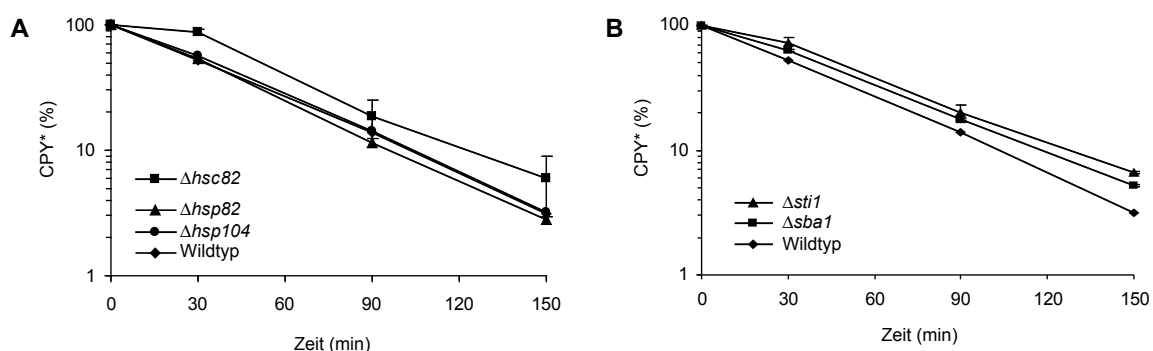


Abbildung 33: **Der CPY* Abbau wird durch die Abwesenheit von Hsc82, Sti1 und Sba1 nicht verlangsamt, aber zeitlich verschoben.** (A) Abbaukinetik von CPY* in W303-1C (Wildtyp), $\Delta hsc82$, $\Delta hsp82$ und $\Delta hsp104$ Zellen. (B) CPY* Abbau in W303-1C (Wildtyp), $\Delta sti1$ und $\Delta sba1$ Zellen. Die „Pulse Chase“ Analysen wurden in (A) und (B) bei 25 °C durchgeführt.

Diskussion

Klonierung und Charakterisierung des *der7-1* Mutantenallels

Die rezessive *der7-1* Mutation ruft Defekte im Abbau von CPY* und PrA* hervor und führt gleichzeitig zu einer verringerten elektrophoretischen Mobilität dieser Proteine (Finger, 1994).

Da das Laufverhalten der Glykoproteine Wbp1 und Pep4, nicht aber das von Sec61 in einer *der7-1* Mutante verändert ist, liegt es nahe, dass nur Proteine mit N-Glykosylierung von der Mutation betroffen sind (Abbildung 6). Bestätigt wird dies durch die Deglykosylierung von CPY* aus Wildtyp und *der7-1* Mutante. Dies führt zu Molekülen gleicher Masse (Abbildung 5). Modifizierungen an der Oligosaccharidstruktur erfolgen durch Prozessierung im ER sowie durch 1,6- und 1,3-Mannosylierung im Golgi-Apparat (zusammengefasst in Mormen *et al.*, 1994). Da jedoch CPY* keine golgi-typische 1,6-Mannosylierung in der *der7-1* Mutante aufweist (Abbildung 5), muss eine defekte Reifung der Oligosaccharide im ER der Grund für die Erhöhung des Molekulargewichts sein.

An der Prozessierung der Oligosaccharide im ER der Hefe *S. cerevisiae* sind unter anderem die Enzyme Glukosidase I (Cwh41) und Glukosidase II (Rot2) beteiligt (Bause *et al.*, 1986; Kilker *et al.*, 1981; Romero *et al.*, 1997; Saunier *et al.*, 1982; Trombetta *et al.*, 1996), zusammengefasst in Herscovics, 1999). Da Stämme mit den Mutationen *der7-1* und Δ *cwh41*, sowie heterozygot diploider *der7-1/\Delta**cwh41* Mutation das Laufverhalten der Glykoproteine Wbp1 und Pep4 in gleicher Weise beeinflussen, scheinen *der7-1* und *CWH41* allelisch zu sein (Abbildung 6). Um Fehlinterpretationen durch Gendosis Effekte oder durch nicht allelische nicht komplementierende Gene des diploiden *der7-1/\Delta**cwh41* Stammes auszuschließen, wurden weitere Experimente zur Identifizierung von *der7-1* durchgeführt. Eine erste Bestätigung für die Identität von *DER7* liefert die Beobachtung, dass die Expression von plasmidkodierter Glukosidase I die Defekte einer *der7-1* Mutante teilweise komplementiert (Abbildung 7). Aus der vollständigen Sequenzierung des Hefegenoms ist bekannt, dass die Gene *CWH41* und *TRP5* nebeneinander auf Chromosom VII lokalisiert sind. Die meiotische Kartierung von *der7-1* zeigte, dass die Gene von *der7-1* und *TRP5* ebenfalls benachbart sind.

Fasst man die obigen Ergebnisse zusammen, so folgt daraus, dass *DER7* mit dem für Glukosidase I kodierenden Gen *CWH41* auf Chromosom VII identisch ist. Cwh41 ist ein glykosyliertes, 107 kDa schweres Typ II Transmembranprotein, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Jiang *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997). Es wird außerdem noch eine lösliche Form (98 kDa) gefunden, die durch eine unbekannte proteolytische Spaltung nahe des N-Terminus entsteht (Bause *et al.*, 1986; Dhanawansa *et al.*, 2002; Kilker *et al.*, 1981). Das Enzym Glukosidase I (EC 3.2.1.106) ist in allen Eukaryonten, außer in Trypanosomen, vorhanden (Dairaku und Spiro, 1997; Parodi, 1993). Es ist an der proteolytischen Reifung von Glykoproteinen im ER beteiligt. Dabei katalysiert das Enzym die Abspaltung des terminalen

α 1,2-Glukoserests von $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ beim sogenannten Trimmen (Prozessierung) der Oligosaccharide im ER. Erst nach erfolgreicher Prozessierung durch Glukosidase I kann Glukosidase II die zwei α 1,3-gebundenen Glukosereste abspalten. Die enzymatische Aktivität der α 1,2-Mannosidase ist dagegen unabhängig von der Glukosidase I Aktivität. Sie entfernt einen α 1,2-Mannoserest des $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ Oligosaccharids. Die defekte Glukosidase I Aktivität führt deshalb zu einer $\text{Glc}_3\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ Oligosaccharidstruktur von CPY* in *der7-1* Mutanten. Die drei zusätzlichen Glukosereste je N-Glykosid erhöhen die molekulare Masse im SDS-PAGE (Abbildung 3 und 4, CPY*: von 67 kDa auf ca. 70 kDa). $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ wurde als eine ideale Struktur für den Abbau missgefalteter glykosylierter Proteine identifiziert. Sie bindet an das Lektin Htm1, welches für den effizienten Abbau von Glykoproteinen als notwendig gefunden wurde. Abweichungen davon, führten zu einer verlangsamten Degradation der Substrate (Jakob *et al.*, 1998a; Knop *et al.*, 1996b; vergleiche auch Abbildung 3). Falsche Kohlehydratstrukturen behindern die zum effizienten Abbau von missgefalteten Proteinen notwendige Bindung an Lektine wie Htm1 (Jakob *et al.*, 2001).

Die veränderte Oligosaccharidstruktur führt zu pleiotropen Effekten in Glukosidase I Mutanten. So konnte Glukosidase I aus einer Mutagenese erhalten werden, bei der Calcofluor White Hypersensitive (CWH) Stämme gesucht wurden. Dabei wurde auch eine erhöhte Resistenz der Nullmutante gegen das K1 Killer Toxin festgestellt. Beide Phänotypen sind vermutlich auf einen um 50 % reduzierten β 1,6-Glukan Gehalt der Zellwand zurückzuführen (Jiang *et al.*, 1996; Ram *et al.*, 1994; Simons *et al.*, 1998). Der Einfluss auf den β 1,6-Glukan Gehalt der Zellwand ist wahrscheinlich indirekt. Abeijon und Chen (1998) stellten fest, dass die Menge an Kre6, einer mutmaßlichen Golgi Glukansynthase, in Δcwh41 Mutanten stark reduziert ist. Vermutlich wird das Kre6 Protein wegen der veränderten Oligosaccharidstruktur unvollständig gefaltet und deshalb von der ER-Qualitätskontrolle dem Abbau zugeführt. Es bleibt abzuwarten, ob diese Beobachtung auf weitere Glykoproteine zutrifft.

Synergistische Effekte von Doppelmutanten mit Defekten in Glukosidase I oder II kombiniert mit Defekten in den Proteinen Kar2 oder Cne1 auf die β 1,6-Glukan Synthese legen nahe, dass die Aktivität der Glukosidasen für die Faltung spezifischer Glykoproteine der β 1,6-Glukan Synthese notwendig sind (Shahinian *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1998).

Diese Arbeit und die Befunde von Jakob *et al.* (1998b) unterstützen diese Annahme. Sie zeigen, dass eine veränderte Oligosaccharidstruktur die Faltung und/oder die Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum beeinflussen. So wird unter mild reduzierenden Bedingungen der UPR in Glukosidase II Mutanten stärker induziert als im Wildtyp. Deshalb führt das Abschalten des UPR in *der7-1* Δire1 Doppelmutanten auch zu einem gestörten Wachstum der Zelle bei erhöhter Temperatur (Abbildung 10). Die Temperaturerhöhung bewirkt einen Anstieg an missgefalteten Proteinen und verstärkt damit den schon vorhandenen Stresspegel.

Bei Wachstumstests konnte ein leicht temperaturabhängiges Wachstum der *der7-1* Mutante beobachtet werden (Abbildung 10). Für Δcwh41 Mutanten war dies bisher nicht bekannt. Dieses

unterschiedliche Verhalten, könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Stammhintergründe zurückgeführt werden. Denkbar wäre aber auch ein allelspezifischer Effekt des von *der7-1* kodierten Proteins. Sollte das mutierte Protein Oligosaccharide binden, diese aber nicht mehr trimmen, dann könnte die weitere Bindung faltungsunterstützender Proteine behindert sein und die effiziente Faltung einiger essentieller sekretorischer Proteine verhindert werden. Zwar weiß man, dass sich eine unvollständig getrimmte Oligosaccharid Struktur bei der Mehrheit der sekretorischen Glykoproteine nicht auf die Reifung auswirkt (Esmon *et al.*, 1984; Jakob *et al.*, 1998b; Simons *et al.*, 1998). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine gereifte N-Glykosid Struktur für die Faltung und/oder Aktivität einiger, das Wachstum beeinflussender Proteine, wie z. B. Kre6, wichtig ist.

Bis heute ist noch immer nicht vollständig verstanden, warum sekretorische Proteine durch das Anhängen von Oligosacchariden modifiziert werden. Man vermutet, dass die Funktion der N-Glykoside darin besteht, die Aufmerksamkeit des Qualitätskontrollsystem auf bestimmte (sich schlecht faltende?) Bereiche des Proteins zu lenken. Es ist daher möglich, dass die schrittweise Reifung der N-Glykoside – durch die α -Glukosidase I und II – die Bindung zusätzlicher faltungsunterstützender Proteine ermöglicht und dadurch die Effizienz des Erreichens der korrekten räumlichen Struktur gesteigert wird. Die Überexpression von ER-luminalen Chaperonen sowie der Proteine Cne1, Mns1 oder Htm1 und deren Einfluss auf den Abbau von CPY* bzw. CTG* in *der7-1* Mutante, könnte Aufschluss über beteiligte Komponenten an der Faltung und/oder Qualitätskontrolle von löslichen und membranständigen Proteinen geben. Eine zusätzliche Identifizierung von Proteinen die mit falsch gefalteten Glykoproteinen in Glukosidase Mutanten wechselwirken, würde zur Aufklärung von Mechanismen der Faltungs- und Qualitätskontrollmaschinerie im ER beitragen.

Eigenschaften von Der1 und zu Der1 homologen Proteinen

Substratspektrum und Topologie von Der1

Eines der ersten Proteine, dessen Beteiligung am Abbau falsch gefalteter Proteine im ER nachgewiesen wurde, war das Protein Der1 (Knop *et al.*, 1996a). Obwohl bis heute weitere ERAD Komponenten identifiziert und ihre Funktion bestimmt wurde, blieb die Rolle von Der1 unklar. Es hat sich jedoch gezeigt, dass das Protein Der1 nur zum Abbau der löslichen Substratproteine PrA*, CPY* (Knop *et al.*, 1996a) und KNH_t (Vashist *et al.*, 2001) notwendig ist, während Membranproteine wie z. B. missgefaltetes Pdr5* (Plempner *et al.*, 1998) oder überzählige Vph1 Untereinheiten (Hill und Cooper, 2000) unabhängig davon abgebaut werden. Die Verwendung von vergleichbaren, da auf CPY*, als Abbausignal basierten, ERAD Modellsubstraten (Abbildung 11A), ermöglichte es nun eine allgemeingültige Aussage bezüglich der Substratspezifität des Der1 Proteins zu treffen. Während der Abbau von CPY* in einer Δ *der1* Nullmutante blockiert ist, wird das Membranprotein CTG* abgebaut (Abbildung 11C).

Daraus ist zu erkennen, dass die Funktion des Der1 Proteins nicht an der Erkennung der Missfaltung, bei beiden Substraten durch die Punktmutation in CPY* vorgegeben, beteiligt ist. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass Der1 eine Rolle als Chaperon besitzt. Vielmehr wäre vorstellbar, dass Der1 an der Erkennung oder dem Transport löslicher Proteine, zum oder durch den Retro-translokationskanal, beteiligt ist.

Genetische Untersuchungen mit Hilfe von Der1-Fusionsproteinen bestätigten die für Der1 vorhergesagte Membrantopologie mit vier Transmembrandomänen. Die N- und C-Termini sind im Zytosol lokalisiert (Abbildung 14 bis 16). Aufgrund seiner Membrantopologie könnte Der1 durchaus Teil eines Komplexes sein, der, vergleichbar der Rolle des Sec62-Sec63 Komplexes beim posttranslationalen ER-Import (Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995), als Rezeptor für Proteine der ER-Qualitätskontrolle fungiert und das Sec61 Translokon zum Retrotranslokon für lösliche Proteine umpolt.

Weitere Hinweise auf molekulare Eigenschaften von Der1 wurden durch die Analyse der Funktionalität von Der1-Fusionsproteinen erhalten. Sowohl die N-terminale Markierung, als auch Einschübe in hydrophile Segmente führten zu einem inaktiven Protein (Abbildung 19). Lediglich kleine C-terminale Veränderungen werden toleriert und erhalten die Funktionalität (Abbildung 18 und 19; Knop *et al.*, 1996a). Diese Sensitivität gegenüber strukturellen Änderungen könnte darauf hindeuten, dass Der1 Teil eines Komplexes ist. Die hydrophilen Der1 Peptidsegmente könnten als Kontaktstellen für zytosolische und/oder ER-luminale Bindungspartner dienen. Hinweise auf eine zytosolische Funktion ergeben sich auch aus dem Vergleich des Der1 Proteins mit seinem Hefehomologen Dfm1 (siehe Kapitel „Der1 homologe Proteine“). Während die ER-luminalen Segmente der Proteine Dfm1 und Der1 von vergleichbarer Größe sind, zeigen alle zytosolische Domänen in Dfm1 eine zum Teil auffällig verlängerte Polypeptidkette (Abbildung 25). Dies macht eine mögliche – wenn auch unterschiedliche – zytosolische Funktion für beide Proteine plausibel. Zusätzliche Hinweise auf eine mögliche ER-luminale und zytosolische Funktion von Der1 erhält man aus dem Sequenzvergleich von Der1 homologen Proteinen (siehe Anhang „Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine“). In allen hydrophilen Bereichen zwischen den Transmembrandomänen sind konservierte Aminosäuren vorhanden, die eine Rolle als funktionsloses Verbindungsglied unwahrscheinlich machen. Diese Hypothese wird durch die Identifizierung der Punktmutation im *der1-2* Allel unterstützt. Die Punktmutation führt zu einem Austausch von Serin nach Leucin (S59L) in der ersten ER-luminalen Schleife, nahe der zweiten Transmembrandomäne, von Der1 (Abbildung 20). Dieser Austausch erscheint nicht drastisch genug, um schwerwiegende topologische Änderungen nach sich zu ziehen. Denkbar ist aber, dass er ausreicht, um eine ER-luminale Funktion von Der1 zu stören.

Suche nach Bindungspartnern von Der1

Um Bindungspartner des Der1 Proteins zu finden, wurde versucht den Defekt des *der1-2* Allels in einer *der1-2 Δire1* Doppelmutante durch Überexpression einer Hefe-Genbank zu supprimieren. Es wurden 19 Genbankplasmide erhalten, die das Wachstum von *der1-2 Δire1* Doppelmutanten bei 37 °C wiederherstellten (Abbildung 22A und Tabelle 1). Überraschenderweise stellte sich heraus, dass keine *der1-2* allelspezifischen Suppressor-Kandidaten erhalten wurden. So ermöglichten alle isolierten Genbankplasmide auch das Wachstum von Δ *der1 Δire1* Doppelmutanten bei 37 °C (Abbildung 22B). Außerdem war kein Suppressor in der Lage den Abbaufekt von CPY* in *der1-2* Mutanten aufzuheben (Abbildung 23). Im Gegenteil, die Expression einiger Kandidaten führte sogar eher zu einer verzögerten Degradation (nicht gezeigt).

Wie kann dieses Ergebnis erklärt werden? Die Verwendung einer Doppelmutante (*der1-2 Δire1*) führt zwangsläufig auch zur Isolierung von Suppressoren die beide Defekte unterdrücken. Vor der Durchführung des Screens wurde schon festgestellt, dass das Wachstum einer *Δire1* Einzelmutante ab ca. 38,5 °C sichtbar beeinträchtigt ist. Daher musste ein relativ enger Temperaturbereich (36 bis 38,5 °C) eingehalten werden. Abweichungen davon können zur Isolierung falsch positiver Suppressoren beitragen. Weiterhin wäre denkbar, dass die Expression zytosolischer Proteine, wie sie z. B. von den Suppressor-Kandidaten K150 (Sis1, DnaJ homolog; Luke *et al.*, 1991) und K176 (Hch1; Nathan *et al.*, 1999) kodiert werden, sowohl ungefaltete (zytosolische) Proteine, als auch Zwischenprodukte des ERAD stabilisieren und dadurch gleichzeitig stress- und degradationshemmend wirken. Ebenso ist auch vorstellbar, dass einige genomische Fragmente für bisher unbekannte Proteine kodieren, die eine UPR ähnliche Transkription von stressreduzierenden Proteinen auslösen können. Höhere Eukaryonten verwenden solche alternativen Signalwege um auf unterschiedliche Arten von ER-Stress zu reagieren (zusammengefasst in Hampton, 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass *Δire1* Mutanten auch Defekte im Inositol Syntheseweg besitzen (IRE: high inositol requiring; Nikawa und Yamashita, 1992; zusammengefasst in Greenberg und Lopes, 1996). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass pleiotrope Effekte in Δ *der1/der1-2 Δire1* Doppelmutanten zur konditionalen Letalität führen. Das würde ebenfalls in der Isolierung nicht *der1-2* spezifischer Suppressoren resultieren. Eine weitere mögliche Erklärung liefert die kürzlich gewonnene Erkenntnis, dass Mutanten mit gleichzeitigen Defekten in ERAD und UPR bei zusätzlichem Stress apoptotische Marker offenbaren (Kaneko *et al.*, 2002; C. Scheiber, persönliche Mitteilung). Daher wäre es auch möglich, dass Suppressoren erhalten wurden, die apoptotische Signalwege in *der1-2 Δire1* und Δ *der1 Δire1* Doppelmutanten unterdrücken.

Weiterführende Untersuchungen, wie z. B. die Expression der erhaltenen Genbankplasmide in weitere Mutanten mit defektem ERAD und UPR könnte klären, wo die einzelnen Suppressoren einzuordnen sind. Zusätzlich könnte auch getestet werden, ob die Genbankplasmide erneute UPR Induktion in *Δire1* Nullmutanten bewirken können.

Die Frage nach Bindungspartnern des Der1 Proteins bleibt damit weiterhin offen. Koimmunopräzipitation, Blue-Native Gelelektrophorese oder 2-Hybrid Analyse sind weitere Methoden die zur Identifizierung von Der1 Bindungspartnern verwendet werden können. Damit sollte dann auch eine genauere Beantwortung der Frage nach der zellulären Funktion des Der1 Proteins möglich sein.

Eine weitere zu beantwortende Frage wäre auch, wie nicht glykosylierte Proteine von der ER-Qualitätskontrolle zur Retrotranslokations- bzw. Abbaumaschinerie gelangen. Ist dieser Mechanismus bei löslichen und membranständigen Proteinen unterschiedlich, oder gibt es Gemeinsamkeiten in verwendeten Komponenten? Die oben beschriebenen Interaktionsstudien mit dem Der1 Protein, einer scheinbar nur für die Degradation löslicher ERAD Substrate benötigte Komponente, und damit verbunden die Identifizierung von Der1 Bindungspartnern könnten auch hier mögliche Antworten geben.

Der1 homologe Proteine

Ein weiterer Ansatz, der Funktion des Der1 Proteins näherzukommen, war der Vergleich von Der1 mit den homologen Proteinen R151.6 aus *C. elegans* und Ydr411c aus der Hefe *S. cerevisiae* (Abbildung 24). Ihre Homologie zur Aminosäuresequenz von Der1 ist zwar wenig ausgeprägt (ca. 25% Identität), mutmaßliche Transmembrandomänen befinden sich jedoch an ähnlichen Positionen in der Proteinkette (Abbildung 25). Zusätzlich sind konservierte Aminosäuren, vor allem in den hydrophilen Segmenten, in allen Homologen vorhanden (siehe Anhang „Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine“). Aufgrund der Zugehörigkeit von Ydr411c zur Familie „Der1-ähnlicher“ Proteine wurde es Dfm1 (Der1-like family member) genannt.

Da die Funktion von beiden Proteinen unbekannt ist, konnten zunächst keine direkten Rückschlüsse auf die Funktion von Der1 gezogen werden. Jedoch könnten die im Vergleich zum Der1 Protein verlängerten zytosolischen Domänen von Dfm1 ein Hinweis auf eine zytosolische Funktion der Der1-Familien Proteine sein. Da aber Sequenz- und Strukturhomologie nicht zwingend die gleiche Funktion von Proteinen bedeutet, wurde zunächst eine Charakterisierung von Dfm1 vorgenommen und anschließend seine Beteiligung an der ER-assoziierten Degradation untersucht.

Indirekte Immunofluoreszenz, dargestellt in Abbildung 28, zeigt die Kollokalisierung von epitopmarkiertem Dfm1-3HA Protein mit dem ER Membranprotein Sec61 (Stirling *et al.*, 1992). Allerdings ist nicht bekannt, ob das markierte Protein biologisch aktiv ist. Dies könnte zu einer Misslokalisierung führen. Die zytosolische Lokalisierung des Carboxyterminus von Dfm1 wurde mit einem Proteaseschutz Experiment identifiziert (Abbildung 16B). Kombiniert man diese Ergebnisse mit der für das Dfm1 Protein vorhergesagten Membrantopologie (Abbildung 25), dann ist Dfm1 ein ER-Membranprotein mit vier Transmembrandomänen und zytosolischen N- und C-Termini.

Es stellte sich nun die Frage, ob das Protein Dfm1 an der ER-assoziierten Degradation beteiligt ist und ob es eventuell ein, im Vergleich zu Der1, verändertes Substratspektrum (z. B. Membranproteine) besitzt. Wachstumsvergleiche von *sec61-2* und *sec61-2 Δdfm1* Stämmen zeigten jedoch keine Beteiligung des Dfm1 Proteins am Abbau des Membranproteins Sec61-2 (Abbildung 30). Ein weiterer Hinweis, dass Dfm1 möglicherweise keine Komponente der ER-Qualitätskontrolle darstellt, ist das Wachstum von *Δdfm1 Δire1* Doppelmutanten bei 37 °C (Abbildung 29). Alle bisher getesteten Komponenten der ER-Qualitätskontrolle besitzen in Kombination mit *Δire1* Mutanten Wachstumsdefekte bei 37 °C (Casagrande *et al.*, 2000; Friedländer *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000).

Bei der „Pulse Chase“ Analyse des CPY* Abbaus in *Δdfm1* und *Δder1 Δdfm1* Mutanten wurde eine äußerst schwach verzögerte Degradation festgestellt (Abbildung 31). Ähnliche Untersuchungen von Caldwell *et al.* (2001) konnten das nicht zeigen. Dies liegt möglicherweise an den gewählten Zeitpunkten der Probenahme und/oder der Genauigkeit der gewählten Methode.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Einfluss des Dfm1 Proteins auf die ER-assoziierte Degradation indirekt ist. Das unterschiedliche Verhalten von Der1 und Dfm1 wird verständlich, wenn man die C-Termini beider Proteine gegenüberstellt. Im Vergleich zu Der1 ist der C-Terminus von Dfm1 um ca. 75 Aminosäuren verlängert. Die computergestützte Analyse des verlängerten Carboxyterminus von Dfm1 mit WU-Blast2 und PatMatch (beide SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces), enthüllte dort das sich wiederholende Aminosäuremuster FxGRGQRbG. Es ist in ähnlicher Form noch in fünf weiteren Hefeproteinen vorhanden (Abbildung 26). Vier dieser Proteine werden mit Ubiquitin (Shp1, Ufd1, Apc1) bzw. Ubiquitin ähnlich (Wss1) regulierten Prozessen in Verbindung gebracht. Das Fünfte, Ykl107w, ist ein noch unbekanntes Protein. Interessant ist, dass die Proteine Shp1 (p47 in *H. sapiens*) und Ufd1 in unterschiedlichen Komplexen zusammen mit der AAA-ATPase Cdc48 bzw. einem homologen höherer Eukaryonten, p97, gefunden werden. Während aber der Shp1/p47-Cdc48 Komplex an der homotypischen Membranfusion beteiligt ist, wird der Ufd1-Cdc48-Npl4 Komplex bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Proteindegradation sowie im ERAD Prozess gefunden (Braun *et al.*, 2002; Ghislain *et al.*, 1996; Jarosch *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2002; Rape *et al.*, 2001; Rape und Jentsch, 2002). Dfm1 könnte deshalb eine Funktion in Ubiquitin oder Ubiquitin ähnlich regulierten Prozessen, z. B. im sekretorischen Weg beim regulierten Auf- oder Abbau von Vesikeln, besitzen. Damit könnten auch die indirekten Effekte auf die Degradation von CPY* erklärt werden. Die Arbeiten von Caldwell *et al.* (2001) und Taxis *et al.* (2002) zeigen einen ähnlichen Einfluss von Mutanten, die den Transport sekretorischer Proteine beeinflussen, auf den ERAD von CPY*. Diese Effekte werden mit einer gestörten der ER Morphologie, der Misslokalisierung des Kar2 Proteins und einem gestörten ER-Golgi Fluss von an ERAD beteiligten Komponenten begründet. Die Untersuchung der Reifung

sekretorischer Markerproteine wie CPY, Gas1 und Emp47 in $\Delta dfm1$ Mutanten könnte darüber Aufschluss geben ob Dfm1 am Vesikelfluss beteiligt ist. Weiterführende Experimente, wie z. B. Koimmunopräzipitation oder Blue Native Gelelektrophorese, können zur Identifizierung von Bindungspartnern verwendet werden und damit zur Aufklärung der Funktion von Dfm1 beitragen.

Eine interessante Frage war, ob die Funktion des Der1 Proteins evolutionär konserviert ist. Tatsächlich ermöglicht die heterologe Überexpression des *C. elegans* Proteins R151.6 das Wachstum von $\Delta der1 \Delta ire1$ Hefen bei 37 °C (Abbildung 32). Die Ursache der unvollständigen Komplementation durch das R151.6 Protein, könnte zum Einen auf strukturelle Unterschiede des *C. elegans* Proteins oder zum Anderen, auf eine geringere Proteinmenge wegen schlechterer Translation der *C. elegans* Kodons in Hefe zurückzuführen sein. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion von Der1 in ERAD auch in höheren Eukaryonten vorhanden ist. Erst vor kurzem wurde ein menschliches Der1 Orthologes (F-LAN-1) durch seine verstärkte Expression in Tumorgewebe identifiziert (Ying *et al.*, 2001). Es bleibt abzuwarten, ob diesem Protein eine Funktion an, mit ERAD in Verbindung gebrachten, Krankheiten wie z. B. Alzheimer oder Parkinson, zugewiesen werden kann (Kostova und Wolf, 2002; Plemper und Wolf, 1999).

Einfluss von zytosolischen Chaperonen auf die Degradation von CPY*

Die Notwendigkeit zytosolischer Chaperone der Hsp70 und Hsp90 Familien am proteasomalen Abbau von Membranproteinen wurde unter anderem an CFTR oder mutiertem Insulinrezeptor bewiesen (Imamura *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001). Für lösliches CPY* dagegen konnte bisher weder die Beteiligung zytosolischer Hsp70 Chaperone der Ssa-Familie, noch die, des mit Hsp70 assoziierten DnaJ Proteins Ydj1 (Hsp40), an der ER-assoziierten Degradation nachgewiesen werden (Deak, 2001).

Die Messung des Abbaus von CPY* in Mutanten der zytosolischen Chaperone der Hsp90 Familie, in Mutanten ihrer Kofaktoren Sba1 und Sti1, sowie in Hsp104 Mutanten, zeigte ebenfalls keine Beteiligung dieser Proteine am Abbau von CPY* (Abbildung 33). Dieses Ergebnis wird durch die Unterschiede der zur Degradation von CT* und CTG* benötigten Komponenten bestätigt (Taxis, 2002). Während membrangebundenes CT*, wie CPY*, aufgrund fehlender zytosolischer Domänen keine zytosolischen Chaperone zum Abbau benötigt, ist die Degradation von CTG* abhängig von Hsp70. Da der Abbau aller drei Proteine vom chaperonartigen Cdc48-Ufd1-Npl4 Komplex abhängig ist, scheinen weitere zytosolische Chaperone nur zusätzlich bei stabil gefalteten zytosolischen Domänen, wie z. B. GFP in CTG*, notwendig zu sein.

Der in $\Delta hsc82$ Nullmutanten, sowie in geringerem Maße in $\Delta sba1$ und $\Delta sti1$ Mutanten,

aufretende verzögerte Beginn der Degradation liegt möglicherweise an einer verminderten Stabilität des Proteins Ire1. In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von IRE1 α durch HSP90 reguliert wird (Marcu *et al.*, 2002). Da zur Bestimmung der Abbaukinetik von CPY* mit „Pulse Chase“ Analyse die Zellen vor der Zugabe von radioaktiv markiertem ³⁵S-Methionin für 50 min in einem Glukose-, Stickstoff- und Schwefel-Mangelmedium gehungert werden, könnte in $\Delta hsc82$ Mutanten diese Zeit ausreichen, um Ire1 vollständig abzubauen und damit den UPR abzuschalten. Dadurch kann es sein, dass zu Beginn der Messung die Menge einiger, zur effizienten Degradation notwendiger, UPR kontrollierter Proteine (wie z. B. Der1) nicht ausreichend ist und der Abbau von CPY* daher verzögert anläuft.

Die Frage, ob zytosolische Chaperone der Hsp90 Familie die Stabilität der Kinase Ire1 in Hefe beeinflussen, könnte durch Vergleich der Gleichgewichtsmengen von Ire1 in Wildtyp und den entsprechenden Mutanten beantwortet werden. Zusätzlich könnte die Verfolgung der Stabilität des Ire1 Proteins mittels „Pulse Chase“, sowie die Stärke der Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR), eine mögliche Destabilisierung von Ire1 in diesen Mutanten aufzeigen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen an drei unterschiedlichen Bereichen der ER-Qualitätskontrolle, (1) der Prozessierung der Oligosaccharide durch die Glukosidase I (Der7/Cwh41), (2) die unterschiedliche Beteiligung des Der1 Proteins am Abbau löslicher und membranständiger Proteine und (3) die – im Gegensatz zu Membranproteinen – von zytosolischen Chaperonen unabhängige Degradation von CPY*, dass die zum effizienten Abbau der einzelnen Substratproteine notwendigen ERAD Komponenten stark von der Natur des Substrats abhängen. Es scheint zwar eine Grundmaschinerie zu existieren, die von vielen Substraten geteilt wird. Die Einzigartigkeit jedes löslichen, membranständigen, glykosylierten oder nichtglykosylierten Proteins erfordert jedoch spezifische Komponenten des Qualitätskontrollsystems, die deren effizienten Abbau gewährleisten.

Literaturverzeichnis

- Abbas-Terki, T., Donze, O., Briand, P.A. and Picard, D. (2001) Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 7569-75.
- Abeijon, C. and Chen, L.Y. (1998) The role of glucosidase I (Cwh41p) in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan is indirect. *Mol Biol Cell*, **9**, 2729-38.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Ausubel, F.M.e.a. (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene, New York.
- Bause, E., Erkens, R., Schweden, J. and Jaenicke, L. (1986) Purification and characterization of trimming glucosidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **206**, 208-212.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A. and Hampton, R.Y. (2001a) 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. (2001b) HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell*, **12**, 4114-4128.
- Bebök, Z., Mazzochi, C., King, S.A., Hong, J.S. and Sorscher, E.J. (1998) The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J Biol Chem*, **273**, 29873-8.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. and Frank, J. (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome- Sec61 complex. *Science*, **278**, 2123-6.
- 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**, 2069-76.
- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science*, **278**, 1806-9.
- Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, **67**, 835-51.
- 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**, 209-22.
- Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. and Davis, R.W. (1979) Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, **8**, 17-24.
- 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**, 615-21.
- Brodsky, J.L. (1996) Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal. *Trends Biochem Sci*, **21**, 122-6.
- Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1997) ER-associated and proteasome-mediated degradation: how two topologically restricted events came together. *Trends in Cell Biology*, **7**, 151-156.
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K.B. and McCracken, A.A. (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem*, **274**, 3453-60.
- Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*, **24**, 136-41.
- Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-66.
- Caldwell, S.R., Hill, K.J. and Cooper, A.A. (2001) Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem*, **276**, 23296-303.
- Camirand, A., Heysen, A., Grondin, B. and Herscovics, A. (1991) Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing alpha-mannosidase. *J Biol Chem*, **266**, 15120-7.
- Caplan, A.J. (1999) Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol*, **9**, 262-8.
- 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**, 729-35.
- Chang, H.C., Nathan, D.F. and Lindquist, S. (1997) *In vivo* analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol Cell Biol*, **17**, 318-25.
- Chen, S. and Smith, D.F. (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, **273**, 35194-200.

- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S.W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science*, **268**, 880-4.
- Chiang, H.L. and Schekman, R. (1991) Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature*, **350**, 313-8.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. and Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**, 119-22.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*, **3**, 93-96.
- Cox, J.S. and Walter, P. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, **87**, 391-404.
- Craven, R.A., Egerton, M. and Stirling, C.J. (1996) A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J*, **15**, 2640-50.
- Dairaku, K. and Spiro, R.G. (1997) Phylogenetic survey of endomannosidase indicates late evolutionary appearance of this N-linked oligosaccharide processing enzyme. *Glycobiology*, **7**, 579-86.
- de Virgilio, M., Weninger, H. and Ivessa, N.E. (1998) Ubiquitination is required for the retrotranslocation of a short-lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, **273**, 9734-43.
- Deak, P.M. (2001) Proteinqualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums: die zentrale Funktion der Ubiquitin-Protein-Ligase Der3/Hrd1p. Dissertation, Universität Stuttgart.
- 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**, 10663-9.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. and Schekman, R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, **349**, 806-808.
- Deshaies, R.J. and Schekman, R. (1987) A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **105**, 633-45.
- Dhanawansa, R., Faridmoayer, A., van der Merwe, G., Li, Y.X. and Scaman, C.H. (2002) Overexpression, purification, and partial characterization of *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha glucosidase I. *Glycobiology*, **12**, 229-34.

- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R. and Kuchler, K. (1995) Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**, 5879-87.
- Egner, R., Thumm, M., Straub, M., Simeon, A., Schuller, H.J. and Wolf, D.H. (1993) Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **268**, 27269-76.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 431-7.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**, 1882-8.
- Esmon, B., Esmon, P.C. and Schekman, R. (1984) Early steps in processing of yeast glycoproteins. *J Biol Chem*, **259**, 10322-7.
- Fang, H., Mullins, C. and Green, N. (1997) In addition to SEC11, a newly identified gene, SPC3, is essential for signal peptidase activity in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **272**, 13152-8.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S. and Weissman, A.M. (2001) The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14422-14427.
- Fang, Y., Fliss, A.E., Rao, J. and Caplan, A.J. (1998) SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 3727-34.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S. and Brodsky, J.L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet*, **35**, 149-91.
- Finger, A. (1994) Proteinabbau im endoplasmatischen Retikulum der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Stuttgart.
- 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**, 565-74.
- Franzusoff, A. and Schekman, R. (1989) Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO J*, 2695-2702.
- 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.
- 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.

- 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**, 4884-99.
- 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**, 1443-56.
- Gillece, P., Pilon, M. and Römisch, K. (2000) The protein translocation channel mediates glycopeptide export across the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4609-14.
- Gilstring, C.F. and Ljungdahl, P.O. (2000) A method for determining the *in vivo* topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. *J Biol Chem*, **275**, 31488-31495.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Larsen, C.N., Schmidt, M. and Finley, D. (2000) The regulatory particle of the yeast proteasome. In Hilt, W. and Wolf, D.H. (eds.), *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*. Eurekah.com, pp. 71-90.
- Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, **94**, 73-82.
- Goes, F.S. and Martin, J. (2001) Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1. *Eur J Biochem*, **268**, 2281-9.
- Greenberg, M.L. and Lopes, J.M. (1996) Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **60**, 1-20.
- Grenert, J.P., Johnson, B.D. and Toft, D.O. (1999) The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J Biol Chem*, **274**, 17525-33.
- 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**, 2519-24.
- 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**, 24891-900.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, London.
- Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E. and Johnson, A.E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*, **89**, 535-44.

- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 913-7.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, **126**, 41-52.
- Hampton, R.Y. (2003) IRE1. A Role in UPRegulation of ER Degradation. *Dev Cell*, **4**, 144-6.
- Hampton, R.Y. and Bhakta, H. (1997) Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12944-8.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. and Akey, C.W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 721-32.
- Hänninen, A.L., Simola, M., Saris, N. and Makarow, M. (1999) The cytoplasmic chaperone hsp104 is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **10**, 3623-32.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-9.
- Heinrich, S.U., Mothes, W., Brunner, J. and Rapoport, T.A. (2000) The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell*, **102**, 233-44.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**, 2364-9.
- Herscovics, A. (1999) Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1426**, 275-85.
- Heinemeyer, W. (2000) Active Sites and Assembly of the 20S Proteasome. In Hilt, W. and Wolf, D.H. (eds.), *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*. Eureka.com, pp. 48-70.
- Hill, K. and Cooper, A.A. (2000) Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system. *EMBO J*, **19**, 550-61.
- 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**, 1725-8.
- Hirsch, C., Blom, D. and Ploegh, H.L. (2003) A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J*, **22**, 1036-46.

- 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**, 3226-41.
- Höhfeld, J., Cyr, D.M. and Patterson, C. (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep*, **2**, 885-90.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A. and Nagata, K. (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep*, **2**, 415-22.
- Hough, R.F., Lingam, A.T. and Bass, B.L. (1999) *Caenorhabditis elegans* mRNAs that encode a protein similar to ADARs derive from an operon containing six genes. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3424-32.
- Hurtley, S.M., Bole, D.G., Hoover-Litty, H., Helenius, A. and Copeland, C.S. (1989) Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol*, **108**, 2117-26.
- Imamura, T., Haruta, T., Takata, Y., Usui, I., Iwata, M., Ishihara, H., Ishiki, M., Ishibashi, O., Ueno, E., Sasaoka, T. and Kobayashi, M. (1998) Involvement of heat shock protein 90 in the degradation of mutant insulin receptors by the proteasome. *J Biol Chem*, **273**, 11183-8.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-8.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **121**, 317-33.
- Jakob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. and Aebi, M. (2001) Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep*, **2**, 423-30.
- Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J. and Aebi, M. (1998a) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol*, **142**, 1223-33.
- Jakob, C.A., Burda, P., te Heesen, S., Aebi, M. and Roth, J. (1998b) Genetic tailoring of N-linked oligosaccharides: the role of glucose residues in glycoprotein processing of *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Glycobiology*, **8**, 155-64.
- 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**, 134-9.

- Jiang, B., Sheraton, J., Ram, A.F., Dijkgraaf, G.J., Klis, F.M. and Bussey, H. (1996) CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta 1,6-glucan assembly. *J Bacteriol*, **178**, 1162-71.
- Johnson, A.E. and van Waes, M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 799-842.
- Kaneko, M., Ishiguro, M., Niinuma, Y., Uesugi, M. and Nomura, Y. (2002) Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. *FEBS Lett*, **532**, 147-52.
- Kilker, R.D., Jr., Saunier, B., Tkacz, J.S. and Herscovics, A. (1981) Partial purification from *Saccharomyces cerevisiae* of a soluble glucosidase which removes the terminal glucose from the oligosaccharide Glc3Man9GlcNAc2. *J Biol Chem*, **256**, 5299-603.
- Knop, M. (1996) Der1, ein neues Protein mit zentraler Funktion beim Abbau von falsch gefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum der Hefe. Dissertation. Universität Stuttgart.
- 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**, 753-63.
- Knop, M., Hauser, N. and Wolf, D.H. (1996b) N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast. *Yeast*, **12**, 1229-38.
- Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T.P., Pappin, D., Freemont, P. and Warren, G. (1997) p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature*, **388**, 75-8.
- Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-30.
- Kopito, R.R. and Sitia, R. (2000) Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep*, **1**, 225-31.
- Kostova, Z. and Wolf, D.H. (2002) Protein quality control in the export pathway: the endoplasmic reticulum and its cytoplasmic proteasome connection. In Dalbex, R. and von Heijne, G. (eds.), *Protein Targeting, Transport & Translocation*. Elsevier Science Ltd., pp. 180-213.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lang, K., Schmid, F.X. and Fischer, G. (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*, **329**, 268-70.
- Lindquist, S. and Kim, G. (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5301-6.

- Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C.M. and Sifers, R.N. (1999) Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, **274**, 5861-7.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1992) SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell*, **71**, 463-78.
- 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**, 953-61.
- Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B. and Riordan, J.R. (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J*, **17**, 6879-87.
- Luke, M.M., Sutton, A. and Arndt, K.T. (1991) Characterization of SIS1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins. *J Cell Biol*, **114**, 623-38.
- Marcu, M.G., Doyle, M., Bertolotti, A., Ron, D., Hendershot, L. and Neckers, L. (2002) Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha. *Mol Cell Biol*, **22**, 8506-13.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strelbel, K. and Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell*, **1**, 565-74.
- Meacham, G.C., Lu, Z., King, S., Sorscher, E., Tousson, A. and Cyr, D.M. (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J*, **18**, 1492-505.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 100-105.
- Meyer, H.H., Shorter, J.G., Seemann, J., Pappin, D. and Warren, G. (2000) A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J*, **19**, 2181-92.
- 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**, 5645-52.
- Milstein, C., Brownlee, G.G., Harrison, T.M. and Mathews, M.B. (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat New Biol*, **239**, 117-20.

- Moriyama, H., Edskes, H.K. and Wickner, R.B. (2000) [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol Cell Biol*, **20**, 8916-22.
- Mormen, K.W., Trimble, R.B. and Herscovics, A. (1994) Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*, **4**, 113-125.
- Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K. and Endo, T. (2001) Mnl1p, an alpha-mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J Biol Chem*, **276**, 8635-8.
- Nathan, D.F., Vos, M.H. and Lindquist, S. (1997) *In vivo* functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12949-56.
- Nathan, D.F., Vos, M.H. and Lindquist, S. (1999) Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1409-14.
- 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.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. and Hegemann, J.H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, **12**, 773-86.
- Nikawa, J.I. and Yamashita, S. (1992) *IRE1* encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1441-1446.
- Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L. and Endo, T. (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol*, **153**, 1061-70.
- Nollen, E.A. and Morimoto, R.I. (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci*, **115**, 2809-16.
- Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H. and High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell*, **10**, 2573-82.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. and Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, 561-70.
- Parodi, A.J. (1993) N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*, **3**, 193-199.

- Parodi, A.J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J*, **348**, 1-13.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, **372**, 475-8.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. and Bouvier, M. (2001) Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem*, **276**, 4416-23.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-8.
- Pilon, M., Schekman, R. and Römisch, K. (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J*, **16**, 4540-8.
- Plemper, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, **388**, 891-5.
- Plemper, R.K., Egner, R., Kuchler, K. and Wolf, D.H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem*, **273**, 32848-56.
- Plemper, R.K. and Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci*, **24**, 266-70.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, **18**, 306-60.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W. and Pearl, L.H. (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J*, **18**, 754-62.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K.U., Diamant, N. and Bar-Nun, S. (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol*, **22**, 626-34.
- Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. and Klis, F.M. (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast*, **10**, 1019-30.
- 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**, 667-77.

- Rape, M. and Jentsch, S. (2002) Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nat Cell Biol*, **4**, E113-6.
- Reddy, P.S. and Corley, R.B. (1998) Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays*, **20**, 546-54.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M. and Neefjes, J. (2000) The major substrates for TAP *in vivo* are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, **404**, 774-8.
- Riezman, H. (1997) The ins and outs of protein translocation. *Science*, **278**, 1728-9.
- Romero, P.A., Dijkgraaf, G.J., Shahinian, S., Herscovics, A. and Bussey, H. (1997) The yeast CWH41 gene encodes glucosidase I. *Glycobiology*, **7**, 997-1004.
- Rose, M.D., Misra, L.M. and Vogel, J.P. (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene [published erratum appears in Cell 1989 Aug 25;58(4): following 801]. *Cell*, **57**, 1211-21.
- Rutishauser, J. and Spiess, M. (2002) Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med Wkly*, **132**, 211-22.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Manniatis, T. (1989) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanchez, Y. and Lindquist, S.L. (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, **248**, 1112-5.
- Saunier, B., Kilker, R.D.J., Tkacz, J.S., Quaroni, A. and Herscovics, A. (1982) Inhibition of N-linked complex oligosaccharide formation by 1-deoxynojirimycin, an inhibitor of processing glucosidases. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14155-14161.
- 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**, 289-96.
- Schirmer, E.C. and Lindquist, S. (1997) Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13932-7.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. and Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol*, **148**, 1203-12.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-4.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G.J., Sdicu, A.M., Thomas, D.Y., Jakob, C.A., Aebi, M. and Bussey, H. (1998) Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **149**, 843-56.

- 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.
- Simons, J.F., Ebersold, M. and Helenius, A. (1998) Cell wall 1,6-beta-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J*, **17**, 396-405.
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Römisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. and Lord, J.M. (1999) Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett*, **459**, 80-4.
- Sommer, T. and Jentsch, S. (1993) A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature*, **365**, 176-9.
- 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**, 129-42.
- Suzuki, T., Park, H., Hollingsworth, N.M., Sternglanz, R. and Lennarz, W.J. (2000) PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase. *J Cell Biol*, **149**, 1039-52.
- Suzuki, T., Park, H., Kwofie, M.A. and Lennarz, W.J. (2001) Rad23 provides a link between the Png1 deglycosylating enzyme and the 26 S proteasome in yeast. *J Biol Chem*, **276**, 21601-7.
- 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**, 2660-74.
- Taxis, C. (2002) Proteinqualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum: Variationen im Abbaumechanismus von löslicher und membrangebundener missgefalteter CarboxypeptidaseY (CPY*). Dissertation, Universität Stuttgart.
- Taxis, C., Vogel, F. and Wolf, D.H. (2002) ER-Golgi Traffic Is a Prerequisite for Efficient ER Degradation. *Mol Biol Cell*, **13**, 1806-18.
- 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**, 249-58.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewinak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc Acids Res*, **24**, 4876-82.
- Trombetta, E.S., Simons, J.F. and Helenius, A. (1996) Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J Biol Chem*, **271**, 27509-16.

- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W.I. and Rapoport, T.A. (2001) Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*, **104**, 937-48.
- Tsai, B., Ye, Y. and Rapoport, T.A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 246-55.
- Tyson, J.R. and Stirling, C.J. (2000) LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, **19**, 6440-52.
- 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**, 355-68.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611-5.
- Wang, Q. and Chang, A. (1999) Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast. *EMBO J*, **18**, 5972-82.
- Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*, **269**, 25710-8.
- Wesche, J., Rapak, A. and Olsnes, S. (1999) Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem*, **274**, 34443-9.
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996a) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, **84**, 769-79.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996b) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-8.
- Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4819-23.
- Yao, T. and Cohen, R.E. (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **419**, 403-7.
- 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.
- Ying, H., Yu, Y. and Xu, Y. (2001) Cloning and characterization of F-LANa, upregulated in human liver cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 394-400.

- Young, J.C. and Hartl, F.U. (2000) Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J*, **19**, 5930-40.
- Zapun, A., Petrescu, S.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1997) Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell*, **88**, 29-38.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron*, **22**, 537-48.
- Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M.L., McCracken, A.A., Watkins, S.C., Michaelis, S. and 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**, 1303-14.

Anhang

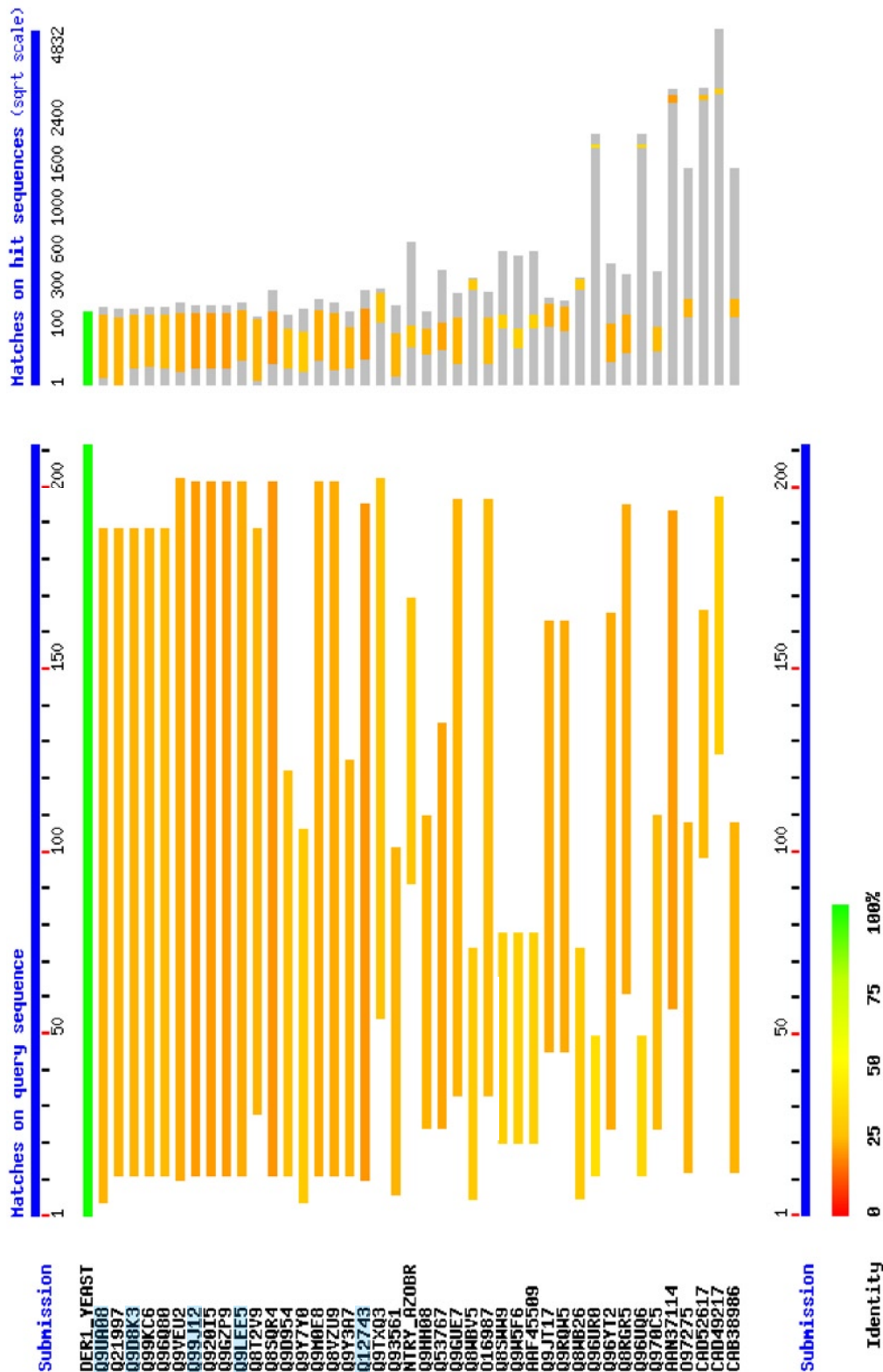
Sequenzierung von *der1-1* und *der1-2*

Vergleich der DNA-Basenabfolge von *DER1* aus W303-1C (Knop, 1996) und S288C (SGD™, Stanford University; genome-www.stanford.edu/Saccharomyces) mit der Basenabfolge der Allele *der1-1* und *der1-2* aus YAF6 (Finger, 1994). Die S59L Punktmutation im *der1-2* Allel ist grau unterlegt. Offene Rechtecke kennzeichnen weitere Punktmutationen, die zu keinem bzw. dem A145V Aminosäureaustausch in W303-1C führen.

<i>DER1</i> W303-1C	ATGGATGCTGTAATACAGAAATCTTTAGCGGACATTCCTTGGTCAAGAATATGGACAATGGGCGTCTGTTGATCAATCAGSTCTCCAGATTCAGGATCCAGGAAAGTAGTGACAGTTATGATTTAGTATTCAAAAAG
<i>DER1</i> S288C	ATGGATGCTGTAATACAGAAATCTTTAGCGGACATTCCTTGGTCAAGAATATGGACAATGGGCGTCTGTTGATCAATCAGSTCTCCAGATTCAGGATCCAGGAAAGTAGTGACAGTTATGATTTAGTATTCAAAAAG
<i>der1-1</i> YAF6	ATGGATGCTGTAATACAGAAATCTTTAGCGGACATTCCTTGGTCAAGAATATGGACAATGGGCGTCTGTTGATCAATCAGSTCTCCAGATTCAGGATCCAGGAAAGTAGTGACAGTTATGATTTAGTATTCAAAAAG
<i>der1-2</i> YAF6	ATGGATGCTGTAATACAGAAATCTTTAGCGGACATTCCTTGGTCAAGAATATGGACAATGGGCGTCTGTTGATCAATCAGSTCTCCAGATTCAGGATCCAGGAAAGTAGTGACAGTTATGATTTAGTATTCAAAAAG
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150	
	* S59L
<i>DER1</i> W303-1C	GGACAATGGGAAGACTATTTATTCGATATTCGATTAGCGGCCATTTAATGGGATATATGATPAAACAATCTTTGTCAGCCCTAATCACTCTGCAACTTTGGAAAACCTCAATCAATCTGGAAGAATAATCTGTTGGATPAATATTTTAA
<i>DER1</i> S288C	GGACAATGGGAAGACTATTTATTCGATATTCGATTAGCGGCCATTTAATGGGATATATGATPAAACAATCTTTGTCAGCCCTAATCACTCTGCAACTTTGGAAAACCTCAATCAATCTGGAAGAATAATCTGTTGGATPAATATTTTAA
<i>der1-1</i> YAF6	GGACAATGGGAAGACTATTTATTCGATATTCGATTAGCGGCCATTTAATGGGATATATGATPAAACAATCTTTGTCAGCCCTAATCACTCTGCAACTTTGGAAAACCTCAATCAATCTGGAAGAATAATCTGTTGGATPAATATTTTAA
<i>der1-2</i> YAF6	GGACAATGGGAAGACTATTTATTCGATATTCGATTAGCGGCCATTTAATGGGATATATGATPAAACAATCTTTGTCAGCCCTAATCACTCTGCAACTTTGGAAAACCTCAATCTGGAAGAATAATCTGTTGGATPAATATTTTAA
.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300	
	* A145V
<i>DER1</i> W303-1C	CTGTTGGTGAATCTGTTAAGATGACACCACTGCAAGCTGCGTGGTGTATTTGATGAGAACTTAAAGAAGCGGAAACCAAAATGAAAGTAACTGCTTGGTCTGTTGATGAGTGGTCTTCCACCA
<i>DER1</i> S288C	CTGTTGGTGAATCTGTTAAGATGACACCACTGCAAGCTGCGTGGTGTATTTGATGAGAACTTAAAGAAGCGGAAACCAAAATGAAAGTAACTGCTTGGTCTGTTGATGAGTGGTCTTCCACCA
<i>der1-1</i> YAF6	CTGTTGGTGAATCTGTTAAGATGACACCACTGCAAGCTGCGTGGTGTATTTGATGAGAACTTAAAGAAGCGGAAACCAAAATGAAAGTAACTGCTTGGTCTGTTGATGAGTGGTCTTCCACCA
<i>der1-2</i> YAF6	CTGTTGGTGAATCTGTTAAGATGACACCACTGCAAGCTGCGTGGTGTATTTGATGAGAACTTAAAGAAGCGGAAACCAAAATGAAAGTAACTGCTTGGTCTGTTGATGAGTGGTCTTCCACCA
.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450	
	* S59L
<i>DER1</i> W303-1C	TCTATATCCCAATCTACATGATCTGTTAATGTAATTTGTTATGTAATGAGCGCACTGCTGGTTAGAAAATGGCCATGAAATTCATGCCAGGTCACTGATGATGATATATAGGAAAGATTTATGCGATCGGATTTGGTAAATCT
<i>DER1</i> S288C	TCTATATCCCAATCTACATGATCTGTTAATGTAATTTGTTATGTAATGAGCGCACTGCTGGTTAGAAAATGGCCATGAAATTCATGCCAGGTCACTGATGATGATATATAGGAAAGATTTATGCGATCGGATTTGGTAAATCT
<i>der1-1</i> YAF6	TCTATATCCCAATCTACATGATCTGTTAATGTAATTTGTTATGTAATGAGCGCACTGCTGGTTAGAAAATGGCCATGAAATTCATGCCAGGTCACTGATGATGATATATAGGAAAGATTTATGCGATCGGATTTGGTAAATCT
<i>der1-2</i> YAF6	TCTATATCCCAATCTACATGATCTGTTAATGTAATTTGTTATGTAATGAGCGCACTGCTGGTTAGAAAATGGCCATGAAATTCATGCCAGGTCACTGATGATGATATATAGGAAAGATTTATGCGATCGGATTTGGTAAATCT
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600	
	* S59L
<i>DER1</i> W303-1C	CCGTACGACTGGTTCGCGCAACACTGAAACACCCCTTAA
<i>DER1</i> S288C	CCGTACGACTGGTTCGCGCAACACTGAAACACCCCTTAA
<i>der1-1</i> YAF6	CCGTACGACTGGTTCGCGCAACACTGAAACACCCCTTAA
<i>der1-2</i> YAF6	CCGTACGACTGGTTCGCGCAACACTGAAACACCCCTTAA
.....610.....620.....630.....	

BlastP

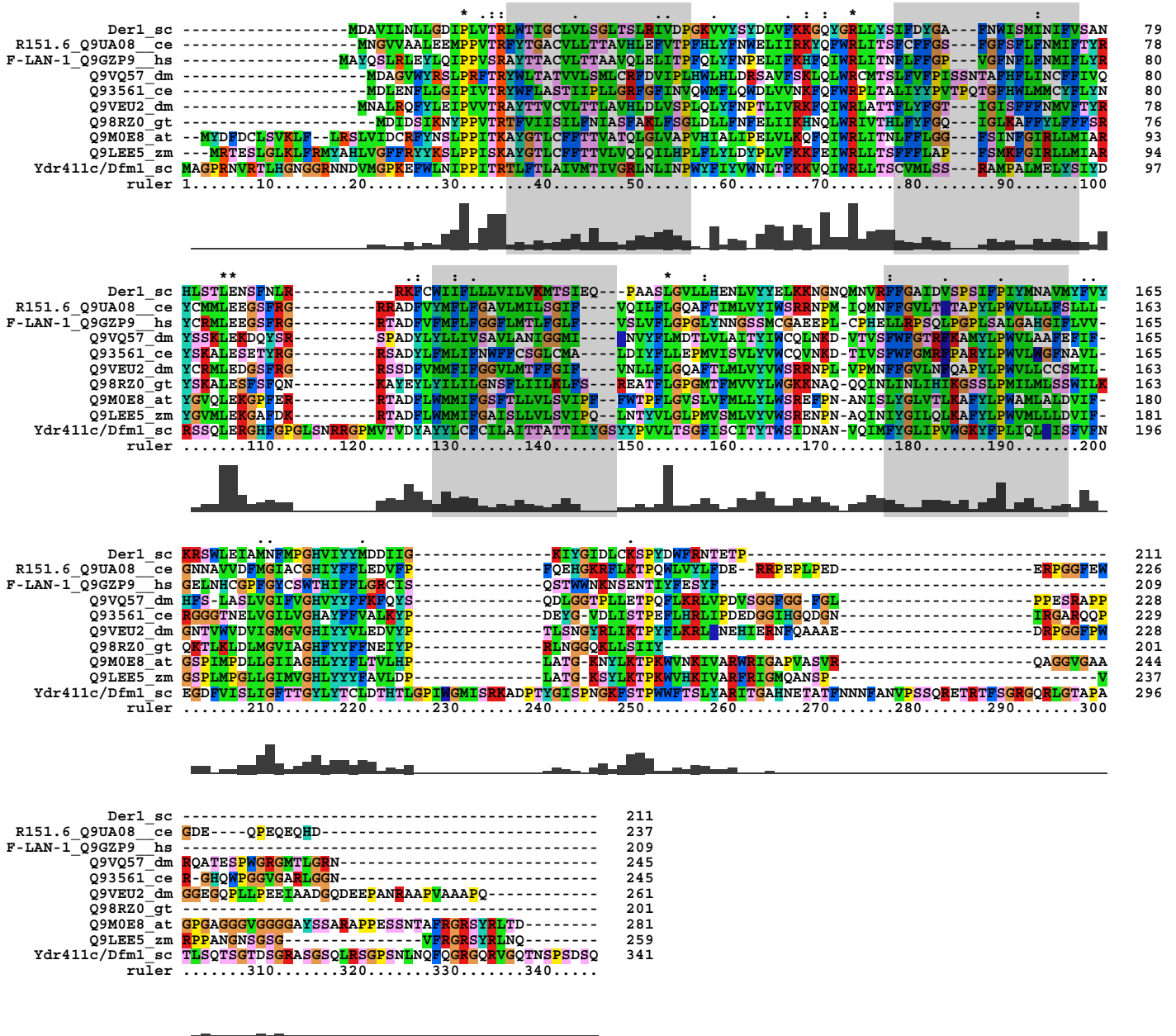
Datenbanksuche mit BlastP nach Der1 homologen Proteinen (Schweizerisches Institut für Bioinformatik (SIB), BLAST Network Service; Altschul *et al.*, 1997). Angegeben sind die „TrEMBL primary accession numbers“ der Proteine.



Q9UA08: R151.6 (*C. elegans*), Q9D8K3: IZP6 (*M. musculus*), Q99J12: FLANA (*M. musculus*), Q9LEE5: SOR (*Zea mays*), Q12743: YDR411c/DFM1

Sequenzvergleich Der1-ähnlicher Proteine

Das Alignment wurde mit ClustalX 1.81 erstellt (Thompson *et al.*, 1997). Sternchen und Balken markieren die Position konservierter Aminosäuren. Graue Boxen geben die ungefähre Lage der Transmembrandomänen im Der1 Protein wieder.



at: *A. thaliana*, ce: *C. elegans*, dm: *D. melanogaster*, gt: *G. theta*, hs: *H. sapiens*, sc: *S. cerevisiae*, zm: *Zea mays*

Veröffentlichungshinweise

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt bzw. in den angegebenen Artikeln veröffentlicht:

Taxis, C., Hitt, R., Park, S.-H., Deak, P. M., and Wolf, D. H. (2003) Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperon requirement of ERAD. *J Biol Chem* (eingereicht)

TMR Network Ubiquitin, Schloß Ringberg, Tegernsee (2001);

Vortrag: "Chaperone function in protein quality control of the endoplasmic reticulum"

16. Tagung: Hefe und verwandte Organismen in Ober-Ramstadt (2000);

Poster: "The role of HSP chaperones in ER-associated degradation of misfolded secretory proteins"

FASEB Ubiquitin Summer Research Conference in Saxtons River/USA (1999);

Poster: "Studies on cytosolic heat shock proteins in ER-associated degradation of misfolded proteins"

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dieter H. Wolf für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut anzufertigen, sowie für seine wertvollen Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Hans Rudolph für seine zahlreichen Tipps und die vielen Diskussionen, sowohl wissenschaftlicher als auch privater Natur. Dank seinem Engagement war es mir möglich tiefe Einblicke in die Mac-Welt zu erhalten.

Bei der Gruppe von Herrn Dr. Thomas Sommer in Berlin, möchte ich mich für die bereitwillige Unterstützung mit „Material und Methoden“ und einer gelungenen Berliner-Kneipen-Besichtigungstour bedanken.

Mein weiterer Dank geht an die lieben Kollegen des gesamten Instituts. Im Speziellen verdanke ich Richard K. Plemper, Sibylle Jäger und Jochen Strayle meine biochemischen Wurzeln. Nicht vergessen möchte ich auch die Kickerkollegen Uli Epple, Frank Josupeit, Jochen Regelman. Sie haben mich durch manches hart umkämpfte Spiel immer wieder aus dem Laboralltag gerissen. Karin Fiebig und Dr. Zlatka Kostova bin ich für diverse Kaffeekränzchen und die dadurch geschaffene angenehme Arbeitsatmosphäre dankbar. Mein herzlichster Dank richtet sich an meinen langjährigen Kickerpartner Christof Taxis. Er hat sich nie gegen ein Brainstorming bei einer weiteren Packung Kekse oder einer Tasse Espresso gewehrt. Sein aufmunterndes Wesen hat mich immer wieder motiviert, unbeschwert in den Tag zu starten. Ich wünsche ihm viel Spaß und Erfolg bei seiner weiteren Forscherkarriere.

Meiner Familie danke ich für die Geduld und Unterstützung während des Studiums und der Dissertation. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Ich danke Heike, dass sie für mich da ist.