

**ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD): Untersuchungen von  
Komponenten zum Abbau glykosylierter und unglykosylierter Substrate**

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

Vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Oliver Fischer  
aus Neuss

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf  
Mitberichter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Hilt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2009

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart

2009

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

Stuttgart, den 22.06.2009

Oliver Fischer

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>14</b>
<i>Syntheseweg sekretorischer Proteine</i> .....	14
<i>Glykosylierung im sekretorischen Weg</i> .....	15
<i>Die Proteinqualitätskontrolle im ER und die ER-abhängige Proteindegradation</i> .....	17
<i>Das „Time-Trimming“-Modell</i> .....	21
<i>Yos9 im „Gatekeeper“-Komplex</i> .....	25
<i>Htm1, das Hefe-EDEM?</i> .....	26
<i>Usa1</i> .....	29
<i>Aufgabenstellung</i> .....	31
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<i>Verbrauchsmaterial und Geräte</i> .....	32
Chemikalien, Medien und Enzyme.....	32
Geräte .....	32
Antikörper .....	33
Peptide.....	34
<i>Übersicht der verwendeten Stämme</i> .....	35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	35
<i>Escherichia coli</i> -Stamm.....	36
<i>Plasmide</i> .....	36
<i>Synthetische Oligonukleotide</i> .....	37

<i>Wachstumsbedingungen von Saccharomyces cerevisiae- und Escherichia coli-Stämmen und Standardmethoden</i> .....	38
<i>Zellbiologische Methoden</i> .....	39
Paarung haploider Stämme.....	39
Sporulation und Tetradendisektion .....	39
Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen.....	39
<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	39
Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe.....	39
Erzeugung von Hefestämmen .....	40
Konstruktion von Plasmiden .....	43
<i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	44
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
Westernblot .....	44
Immunodetektion von Proteinen .....	44
Cycloheximid Chase Analyse .....	45
Pulse-Chase Analyse.....	45
Co-Immunopräzipitation.....	46
Silber-Färbung von Proteinen in SDS-Gelen (Blum, 1987) .....	47
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
<i>Teil 1: Degradationsweg unglykosylierter ERAD Substrate</i> .....	49
CPY*0000 wird nicht vakuolär abgebaut.....	50
CPY*0000 wird über das Proteasom degradiert .....	51
CPY*0000 ist ein ERAD-Substrat .....	53
<i>Teil 2: Usa1-Funktion ist abhängig vom genetischen Hintergrund des verwendeten Stamms</i> .....	55
<i>Teil 3: Interaktionsstudien mit den ER Lektinen Yos9 und Htm1</i> .....	57
Htm1 ist kein fester Bestandteil des „Gatekeeper“-Komplex .....	57
Htm1 und Mns1 sind keine festen Bindungspartner.....	62
<i>Teil 4: Degradationsanalysen zeigen distinkte Funktion von Htm1 und Mns1 am gleichen Substrat auf</i> .....	64
Htm1 und Mns1 besitzen eine additive Funktion in der CPY* Degradation.....	64
Die Überexpression von Htm1 ändert nicht den $\Delta mns1$ -Phänotyp .....	66

Die Überexpression von Mns1 ändert nicht den $\Delta htm1$ -Phänotyp.....	68
<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
<i>Unglykosyliertes CPY* ist ein ERAD-Substrat .....</i>	<i>70</i>
<i>Usa1-Funktion ist abhängig vom Stammhintergrund .....</i>	<i>72</i>
<i>Interaktionsstudien mit den Lektinen Yos9 und Htm1 .....</i>	<i>73</i>
<i>Genetische Zusammenhänge in Degradationsanalysen zeigen distinkte Funktionen von Htm1 und Mns1 an CPY* auf.....</i>	<i>75</i>
<b>Danksagung .....</b>	<b>79</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
Asn	Asparagin
bp	<u>B</u> asenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	COOH = Carbonsäurerest von Aminosäuren
CM	synthetisches Vollmedium ( <i>engl.</i> : <u>c</u> omplete <u>m</u> edium)
CPY	<u>C</u> arboxypeptidase ysc <u>Y</u>
d.h.	das heißt
DNA	<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleinsäure ( <i>engl.</i> : <u>a</u> cid)
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierungsprotein
EDEM	<u>E</u> R- <u>d</u> egradation- <u>e</u> nhancing- <u>m</u> annosidase-like-protein
EDTA	<u>E</u> tylendiamintetra <u>a</u> ccetat
engl.	englisch
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ERAD	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum assoziierte <u>D</u> egradation
ERQC	<u>E</u> R-assoziierte Proteinqualitätskontrolle ( <i>engl.</i> quality <u>c</u> ontrol)
G	Glycin
GFP	<u>G</u> rün fluoreszierendes <u>P</u> rotein
h	Stunde
HIP	<u>H</u> rd1 <u>i</u> ndependent proteolysis
I	Isoleucin
K/HDEL	Peptidsequenz: Lysin- oder Histidin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
min	Minuten
MRH	<u>M</u> annose-6-Phosphat- <u>R</u> ezeptor- <u>H</u> omologie
N	Asparagin
N	Stickstoff
O	Sauerstoff

OD	optische Dichte
OST	<u>O</u> ligo <u>s</u> accharyl- <u>T</u> ransferase
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgele <u>e</u> lektrophorese
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonsäure <u>f</u> luorid
PrA	<u>P</u> roteinase ysc <u>A</u> , Pep4
R	Arginin
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>engl.</i> : <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RT	Raumtemperatur
Q	Glutamin
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>engl.</i> : <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
s.o.	siehe oben
T	Threonin
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendi <u>a</u> min
TCA	<u>T</u> richloressigsäure ( <i>engl.</i> : <u>a</u> cid)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UGT	<u>U</u> DP-Glc:Glykoprotein- <u>G</u> lucosyl <u>t</u> ransferase
UPR	<u>U</u> nfolded <u>P</u> rotein <u>R</u> esponse
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
YPD	Glucose Vollmedium ( <i>engl.</i> : <u>Y</u> east <u>P</u> eptone <u>D</u> extrose)

## Zusammenfassung

Die Funktion von Proteinen hängt von ihrer korrekten Struktur ab. In eukaryontischen Zellen existieren deshalb Protein Qualitätskontrollsysteme, die missgefaltete Proteine erkennen und abbauen können. Für neusynthetisierte sekretorische Proteine befindet sich eine solche Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird allgemein als ER-abhängige Protein Qualitätskontrolle (ERQC) bezeichnet. Missgefaltete Proteine werden im ER über einen retrograden Transport zurück ins Zytosol transportiert und dort über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Man nennt diesen ERQC-abhängigen Abbau von Proteinen die ER-assoziierte Degradation (ERAD). Diese Systeme sind evolutionär hoch konserviert. Man findet sie in allen Eukaryontenzellen von der Hefe bis zum Menschen. Ein für proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden leicht zugänglicher eukaryoter Modellorganismus ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Mehrere Studien mit dem ERAD-Modellsubstrat CPY\* zeigten die Bedeutung der Glykane an Proteinen für die ER-assoziierte Degradation von missgefalteten glykosylierten sekretorischen Proteinen auf. In Wildtypzellen wird glykosyliertes CPY\* mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 20$  min abgebaut; die entsprechend unglykosylierte Variante CPY\*0000 wird stabilisiert mit einer Halbwertszeit von ca.  $t_{1/2} = 90$  min. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die zwar verlangsamte Degradation von CPY\*0000 noch eine von Schlüsselkomponenten des ERAD abhängige Degradation ist. Zunächst wurde in mehreren unabhängigen Pulse-Chase Analysen eine Stabilisierung von CPY\*0000 in einem *pre1-1 pre4-1* Stamm gefunden. Dieser Stamm ist in der Proteasomenaktivität auf 25 % der WT-Peptidaseaktivität reduziert. Eine Stabilisierung von CPY\*0000 wurde in weiteren Pulse-Chase Analysen mit einem  $\Delta$ *der3*-Stamm entdeckt, der die für ERAD-L und -M Weg notwendige E3-Ubiquitin-Ligase Der3 depletiert. Zudem wurde in einer Pulse-Chase Analyse das Abbauverhalten von CPY\*0000 in vakuolären Proteinase defizienten Zellen untersucht. Dabei wurde kein Unterschied zum Abbau von CPY\*0000 in Wildtypzellen festgestellt.

Die beiden ER lumenalen Proteine Yos9 und Htm1 (auch Mnl1 genannt) wurden auf Grund von ersten Studien als Lektine vermutet, die den Glykan-Status an glykosylierten sekretorischen Proteinen detektieren können. Die Glykane an Proteinen dienen im sekretorischen Weg als Stabilitätssignal. In dieser Arbeit wurden *in vivo* Bindungspartner von



Yos9 nachgewiesen. In Immunopräzipitationsexperimenten wurden Bindungen von Yos9 zu seinem Substrat CPY\* und zu ERAD Komponenten Cdc48, Der3, Htm1 und Kar2 gefunden. Die Bindungen von Yos9 zu Cdc48 und Der3 sind Hrd3 abhängig, nicht aber die Bindung zum Substrat, wie weitere Immunopräzipitationen zeigten. Die Bindungen zu Htm1 und Kar2 konnten nicht spezifisch nachgewiesen werden. Speziell eine Bindung von Yos9 mit Htm1 wurde in Co-Immunopräzipitationen untersucht. Hier konnte eine unspezifische Bindung des Yos9 zu Htm1 im Yos9-Präzipitat gefunden werden. Umgekehrt wurde allerdings kein Yos9 immunologisch im Htm1-Präzipitat detektiert. Htm1 wurde in Immunopräzipitationen untersucht und bis auf die unspezifische Bindung zu Kar2 wurden keine Bindungen zu Cdc48, Der3, Sec61 oder zu seinem Substrat CPY\* festgestellt. Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass Htm1 nicht als ER Lektin den Status der Glykane an sekretorischen Proteinen überprüft und dass Htm1 nicht an dem Rückhalt und der Weitergabe zum Ubiquitin-Proteasom-System von fehlgefalteten sekretorischen Proteinen beteiligt ist. In weiteren Co-Immunopräzipitationen wurde auch eine Bindung von Htm1 zu der ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase (Mns1) ausgeschlossen.

Htm1 besitzt eine zu Mns1 homologe Mannosidase-Domäne. In dieser Arbeit wurden deshalb genetische Analysen mit *Htm1* und *Mns1* durchgeführt. Erstmals konnte ein genetischer Zusammenhang zwischen den beiden Genen gefunden werden: Die Gene *MNS1* und *HTM1* haben auf die Degradation von CPY\* einen additiven Effekt. Mit verschiedenen Deletionstämmen wurden Pulse-Chase Analysen im Hinblick auf die Degradation CPY\* durchgeführt. Zellen mit einer Deletion in den Genen *MNS1* oder *Htm1* zeigten jeweils nur noch eine Degradation von CPY\* mit einer Halbwertszeit von ca.  $t_{1/2} = 90$  min auf. Eine  $\Delta mns1 \Delta htm1$  Doppeldeletion in den Zellen führte darüber hinaus zu einer fast vollständigen Stabilisierung von CPY\*. Dieser additive Effekt wurde weiter untersucht. Der  $\Delta mns1 \Delta htm1$  Doppeldeletionsstamm wurde mit einem „high-copy“ Plasmid transformiert, das Htm1 kodierte. In dem resultierenden Stamm konnte eine Überexpression von Htm1 im Vergleich zu chromosomal Htm1 kodierenden Zellen nachgewiesen werden. In Pulse-Chase Analysen wurde nun gezeigt, dass diese Überexpression von Htm1 in den Zellen den  $\Delta mns1$  Phänotyp hinsichtlich der CPY\* Degradation nicht ändert. Analog wurde dieses Experiment mit überexprimierter Mns1 im  $\Delta htm1$  Deletionsstamm durchgeführt und nachgewiesen, dass auch eine Überexpression von Mns1 nicht den  $\Delta htm1$  Phänotyp ändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Htm1 und Mns1 keine redundante Funktion besitzen in der ER-assoziierte

Degradation von CPY\*. Die Funktion der beiden Proteine muss sich trotz des additiven Effekts und der Homologie in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden.

Die Funktion von Usa1 im ERAD ist in Hinblick auf seine Substratspezifität widersprüchlich. Im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von T. Sommer, MDC Berlin, wurde in dieser Arbeit der Abbau von CTG\* in DF5-Stämmen in Abhängigkeit von *USA1* untersucht. Es wurden der DF5-Stamm Wildtyp für *USA1* und der DF5-Stamm  $\Delta usa1$  mit einer *USA1* Deletion mit dem Plasmid, welches CTG\* kodiert, transformiert. Mit den Transformanden wurden zwei unabhängige Pulse-Chase-Analysen durchgeführt. In beiden Versuchen zeigte sich eine deutliche verlangsamte Degradation von CTG\* in den  $\Delta usa1$ -Zellen im Vergleich zu den *USA1*-Wildtypzellen. Da im W303-Stamm keine veränderte Degradation von CTG\* in einer *USA1* Deletion gefunden wurde, unterscheidet sich somit die Funktion von Usa1 je nach genetischen Stammhintergrund.

## Abstract

The function of proteins depends on their correct structure. Therefore, there are protein quality control systems in eukaryotic cells which can recognize and destroy misfolded proteins. For newly synthesized secretory proteins, such a quality control system resides within the endoplasmic reticulum and is called ER-associated quality control system (ERQC). Misfolded proteins in the ER are translocated via retrograde transport back to the cytosol and are degraded there by the ubiquitin-proteasome system. This ERQC-dependent degradation of proteins is called ER-associated degradation (ERAD). Both systems are highly evolutionarily conserved. They are found in all eukaryotic cells from yeast to human. One for protein biochemistry and molecular biological methods easily accessible eukaryotic model organism is the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Several studies with the ERAD model substrate CPY\* demonstrated the relevance of glycans on proteins for the ER-associated degradation of misfolded glycosylated secretory proteins. In wild-type cells glycosylated CPY\* is degraded with a half-life of  $t_{1/2} = 20$  min; the corresponding to CPY\* non-glycosylated variant CPY\*0000 is stabilized to a half-life of about  $t_{1/2} = 90$  min. In this study it was shown for the first time that the although slowed down degradation of CPY\*0000 is still a degradation which depends on key components of ERAD. First, in several independent pulse-chase analysis in a *pre1-1 pre4-1* strain CPY\*0000 was found to be stabilized. This strain is reduced in its proteasome activity to 25 % in comparison to the wild type peptidase activity. A stabilization of CPY\*0000 was discovered in further pulse-chase analysis with a  $\Delta der3$  strain which lacks the necessary E3 ubiquitin ligase Der3 of the ERAD-L and -M way. In addition, a pulse-chase analysis of the degradation behavior of CPY\*0000 vacuolar proteases deficient cells were investigated. There was not any difference detected to the degradation behavior of CPY\*0000 in wild type cells.

The ER luminal proteins Yos9 and Htm1 (also known as Mn11) were based on initial studies suspected to be lectines, which can detect the status of the glycan of a glycosylated secretory protein. The glycans on a glycoprotein act as a stabilization signal in the secretory pathway. In this work, it was possible to find in vivo binding partners of Yos9. In immune precipitations, it was shown that Yos9 binds to its substrate CPY\* and to ERAD components Cdc48, Der3, Htm1, and Kar2. The bindings of Yos9 to Cdc48 and Der3 are depending on Hrd3. But the binding of Yos9 to its substrate does not depend on Hrd3. These results were

shown by further immunoprecipitations with Yos9. The binding of Yos9 to Htm1 and Kar2 could not be demonstrated in a specific manner. Especially a binding between Yos9 and Htm1 was investigated with the co-immunoprecipitation method. Here, a non-specific binding of Yos9 to Htm1 in the Yos9 precipitate was detected. But, there was no Yos9 in an Htm1 precipitate found. Htm1 was investigated in immunoprecipitations, and with the exception of the non-specific binding to Kar2 it was not recognized that Htm1 binds to neither Cdc48, Der3, Sec61, nor to its substrate CPY\*. These results suggest that Htm1 is not a lectine that examines the glycan status of secretory proteins and these results suggest that Htm1 is not involved in the retention or release to the ubiquitin proteasome system of misfolded secretory proteins in the ER. Additional co-immunoprecipitations in this work could exclude that Htm1 and the ER- $\alpha$ 1,2-mannosidase (Mns1) bind to each other.

Htm1 contains a mannosidase domain homolog to Mns1. Thus, genetical analyses were performed with *HTM1* and *MNS1* in this work. For the first time, a genetic relationship between the two genes was found: The genes *HTM1* and *MNS1* have an additive effect on the degradation of CPY\*. Several pulse-chase analyses were performed to investigate the degradation of CPY\*. Cells with a deletion in one of the genes *MNS1* or *HTM1* showed a reduced CPY\* degradation with a half-life of about  $t_{1/2} = 90$  min. Furthermore, a  $\Delta mns1 \Delta htm1$  double deletion strain led to a nearly complete stop of CPY\* degradation *in vivo*. This additive effect was further investigated in this study. The  $\Delta mns1 \Delta htm1$  strain was transformed with a high-copy vector encoding for *HTM1*. In the received strain, an over expression of Htm1 could be detected in comparison to a strain which coded for *HTM1* on the chromosome. Pulse-chase analysis were performed in which the over expression of Htm1 did not affect the phenotype of  $\Delta mns1$  cells in terms of CPY\* degradation. The same experiment was performed vice versa with an over expression of Mns1 in a  $\Delta htm1$  deletion strain and it could be demonstrated that the over expression of Mns1 did not rescue the  $\Delta htm1$  phenotype as well. These results suggest that Htm1 and Mns1 have no redundant function on ER-associated degradation of CPY\*. The function of both proteins must vary in spite of the additive effect and the homology of their amino acid sequence.

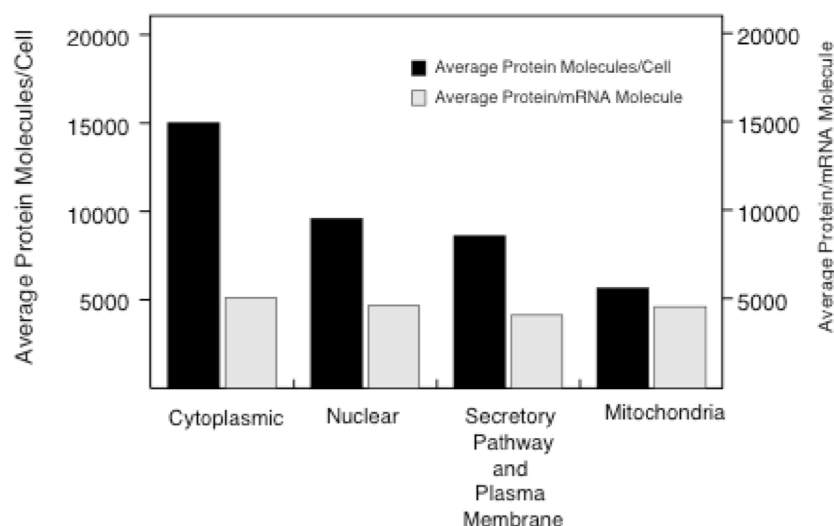
The function of Usa1 in the ERAD is in terms of its substrate specificity contradictory. Within a cooperation with the group of T. Sommer, MDC Berlin, the degradation of CTG\* in DF5 strains depending on the gene *USAI* was investigated. The DF5 strain wild type in *USAI* and the DF5  $\Delta usa1$  strain were transformed with a vector coding for CTG\*. Two independent

pulse-chase analyses were performed with these transformed strains. Both results showed a clearly reduced degradation of CTG\* within the  $\Delta usa1$  strain in comparison to the *USA1* wild-type strain. Since the W303 strain did not show this altered degradation behavior in  $\Delta usa1$  strains, the function of Usa1 differs depending on the genetic strain background.

# Einleitung

## Syntheseweg sekretorischer Proteine

Die im Kern kodierten Proteine einer eukaryontischen Zelle können nach ihrem Wirkort und Syntheseweg unterschieden werden: zytosolische Proteine, mitochondriale und peroxisomale Proteine, Proteine des Zellkerns und sekretorische Proteine. Diese sekretorischen Proteine sind Proteine des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparats, der Vakuole (des Lysosoms), der Plasmamembran, Proteine der endozytotischen und exozytotischen Kompartimente, sowie Proteine, die von der Zelle sekretiert werden, d.h. ihren Wirkort außerhalb der Zelle haben. Den Synthese- und Reifungsweg sekretorischer Proteine hin zum Wirkort wird sekretorischer Weg genannt. Fast 30 % aller während der logarithmischen Wachstumsphase neu synthetisierten Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind Proteine des sekretorischen Weges und der Plasmamembran, (Abb. 1) (Ghaemmaghani *et al.*, 2003).



**Abb. 1: Fast 30 % aller neu-synthetisierten Proteine sind Teil des sekretorischen Weges und Plasmamembranproteine.**

Vergleich der Ergebnisse von mRNA-Quantifizierung (graue Balken) und immunologisch detektierter Proteine (schwarze Balken). Es werden Moleküle pro Hefezelle angegeben. Alle offenen Leserahmen wurden mit einem TAP- bzw. GFP-Epitop versehen und ihre Expression im logarithmischen Wachstum immunologisch bzw. mit Fluoreszenzmessung detektiert. Abbildung übernommen aus (Ghaemmaghani *et al.*, 2003, Figure S6 in „supplementary info“).

Mit Hilfe der Hefegenetik wurden erstmals in größerem Umfang Komponenten des Synthese- und Reifungsweges sekretorischer Proteine gefunden. Diese konnten mit Hilfe sogenannter sec-Mutanten identifiziert werden, die einen Defekt in der Bildung der in der Zellwand-Matrix verankerten Invertase und der in der Vakuole lokalisierten sauren Phosphatase hatten. Diese Komponenten nannte man Sec1, Sec2,...u.s.w. (Kaiser and Schekman, 1990; Novick *et al.*, 1981; Novick *et al.*, 1980). Viele weitere Komponenten und deren Funktion konnten bis heute identifiziert werden. Die sekretorischen Proteine werden an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und auf Grund einer Signalsequenz am N-Terminus über den Importkanal Sec61 linear in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Im ER führen die Ausbildung von Disulfidbrücken, die Anheftung und Modifikation von Kohlehydratstrukturen (Glykosylierung), spezifische proteolytische Spaltungen sowie die Aktivität von Chaperonen zur korrekten Faltung der Proteine. Im ER werden auch Proteinuntereinheiten zu multimeren Komplexen zusammengefügt. Anschließend werden z.B. die sekretorischen Proteine via Vesikeltransport zum Golgi-Apparat gebracht, in dem weitere Modifikationen stattfinden. Von dort aus werden sie in Endosomen zum Zielort dirigiert. ER und Golgi residente Proteine verbleiben in ihrem jeweiligen Kompartiment bzw. werden über retrograden Vesikeltransport in das entsprechenden Kompartiment fortwährend zurückgeführt.

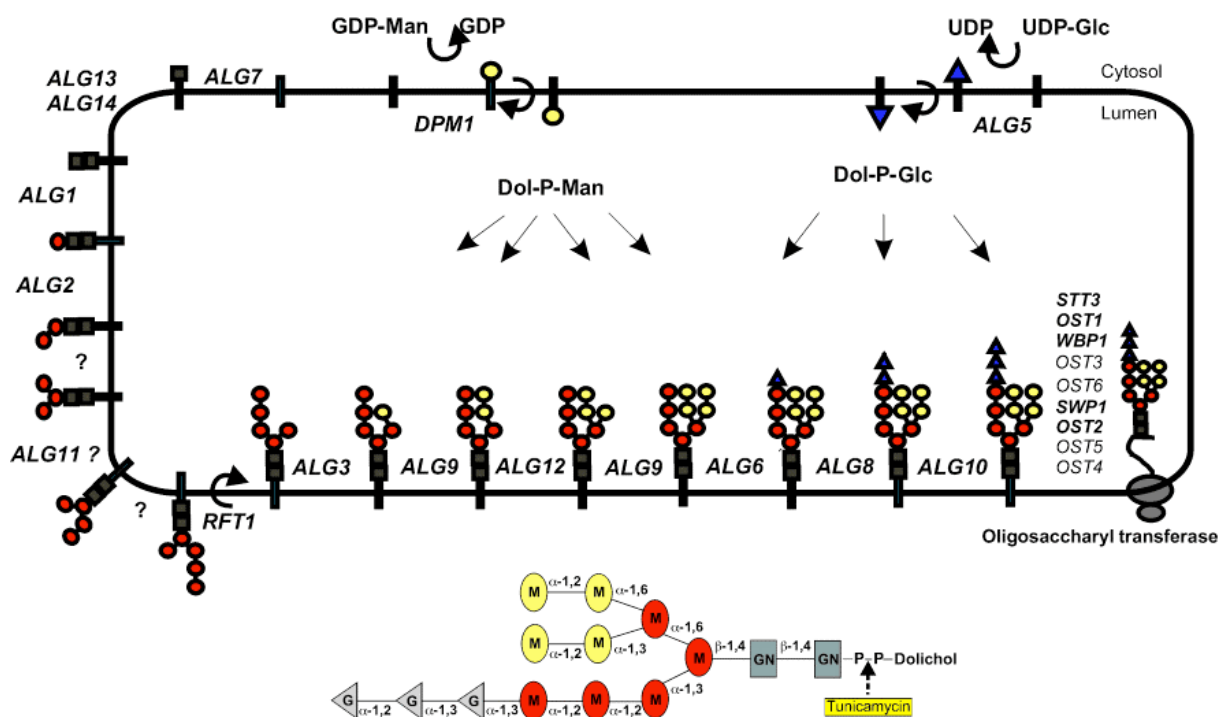
### ***Glykosylierung im sekretorischen Weg***

„Die meisten Proteine sind Glykoproteine.“ Diese pauschale Aussage beruht wohl auf der Entdeckung, dass fast alle Proteine des Hühnereiweißes, des menschlichen Serums und der tierischen Zellmembran Glykoproteine sind. Globale Schätzungen auf Grund bereits gefundener und identifizierter Proteine gehen davon aus, dass bei der Hälfte aller in der Natur vorkommenden Proteine glykosyliert sind (Apweiler *et al.*, 1999). Tatsächlich sind im menschlichen Lebergewebe über die Hälfte der exprimierten Proteine Glykoproteine (Zhou *et al.*, 2007).

Die Funktion der Glykosylierung von Proteinen ist vielfältig. Generell kann man nur sagen, dass Kohlehydrate die Konformation von Proteinen verändern. Sie spielen in vielen biologischen Prozessen eine individuelle Rolle: so z.B. als Schutz vor Proteolyse, bei der Zelladhäsion oder als Stabilitätssignal in der Proteinqualitätskontrolle (Dwek, 1996; Haltiwanger and Lowe, 2004; Helenius and Aebi, 2004; Lehle *et al.*, 2006; Varki, 1993).

Glykoproteine sind entweder an der Aminogruppe der Asparaginseitenkette mit den Oligosaccharidstrukturen verbunden (N-glykosyliert, ca. 90 %) oder über den Sauerstoff an

der Seitenkette einer eine Hydroxylgruppe tragende Aminosäure verbunden (*O*-glykosyliert, ca. 10 %). Die Verknüpfung beginnt im ER beim Import der Proteine. Bei den *O*-glykosylierten Proteinen wird nur eine Mannose im ER gebunden und der weitere Aufbau der Oligosaccharidstruktur erfolgt im Golgi. Bei den *N*-glykosylierten Proteinen wird eine Kohlehydratstruktur der Form  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  an den Stickstoff der Asparaginseitenkette in der Konsensussequenz N-X-S/T (wobei X für jede Aminosäure außer Prolin steht) gebunden. Die Kohlehydratstruktur  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  wird durch den OST-Komplex (Oligosaccharyl-Transferase-Komplex) während des Imports in das ER in einem Schritt auf das Protein übertragen. Die Synthese dieses Glykans erfolgt davor in Stufen zuerst im Zytosol, später im ER-Lumen unter Verwendung nukleotid-aktivierter Zucker und in der ER-Membran verankerten Dolicholphosphats, (Abb. 2) (Lehle *et al.*, 2006).



**Abb. 2: Biosynthese von Lipid-gebundenen Oligosacchariden und deren Transfer auf importierte Proteine im ER von *Saccharomyces cerevisiae*.**

Die Synthese startet auf der zytoplasmatischen Seite des ER mit UDP-GlcNAc und GDP-Man (UD = Uridindiphosphat, GD = Guanosindiphosphat, Man = M = Mannose, Glc = G = Glucose, GlcNAc = *N*-Acetyl-Glucosamin, Dol = Dolichol). Das  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dolichol}$  Heptasaccharid wird dann unter Beteiligung von Rft1 zur luminalen Seite transferiert und mit Dolichol-P-Man und Dolichol-P-Glc verlängert zum Lipid-verankertem Oligosaccharid  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dolichol}$ . Dieses Glykan wird durch den OST-Komplex auf die Seitenkette eines Asparagins in der Sequenz N-X-S/T importierter Proteine übertragen. Tunicamycin inhibiert den Transfer von GlcNAc-Phosphat von UDP-GlcNAc auf Dol-P. Rot markierte Mannose stammt von GDP-Man, gelbe von Dol-P-Man (Lehle *et al.*, 2006).



Diese Glykane dienen nicht nur als Basis für weitere Modifikationen im Golgi. Im ER-Lumen sind sie zunächst notwendig für die Proteinqualitätskontrolle, im Laufe derer die Glykanstruktur weiter modifiziert wird.

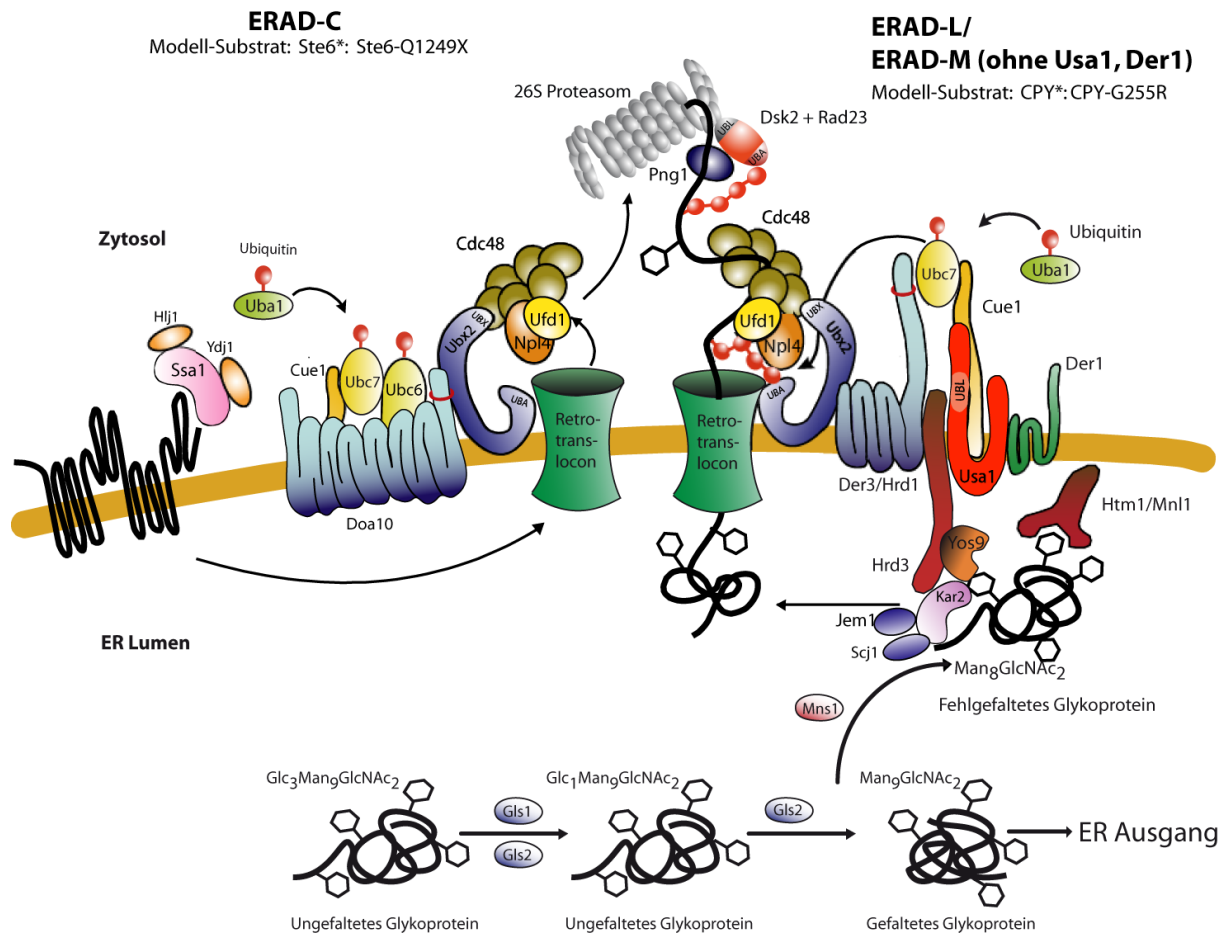
### **Die Proteinqualitätskontrolle im ER und die ER-abhängige Proteindegradation**

Sekretorische Proteine werden als lineare Aminosäureketten über das Sec61 Translokon in das ER-Lumen importiert und müssen hier ihre native Konformation erreichen. Dieser Prozess wird von einer Reihe von Enzymen begleitet, unterstützt und kontrolliert. Dazu gehören u.a. Chaperone, Co-Chaperone, Redox-Enzyme, Prolinisoмерase, Glykanprozessierende Enzyme und Lektine (van Anken and Braakman, 2005). Im ER existiert ein Qualitätsskontrollsystem (ER-Qualitätskontrolle = ERQC), das verhindert, dass fehlgefaltete Proteine, einzelne Monomere größerer Komplexe oder unmodifizierte Proteine, die z.B. aufgrund von genetischen Fehlern oder zellulärem Stress entstanden sind, in den Golgi und an ihren Wirkort gelangen. Solche fehlerhaften Proteine sind potentiell gefährlich für die Zelle und werden anhand hydrophober Bereiche, reaktiver Thiole oder dem Status der Glykane erkannt, aus dem ER wieder ausgeschleust und im Zytosol durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut (Anelli and Sitia, 2008; Ellgaard and Helenius, 2003; Kostova and Wolf, 2003). Hierfür muss es Komponenten in der Zelle geben, die die möglichen Substrate erkennen, die Entscheidung zu deren Abbau fällen, sie im ER zurückhalten und dem UPS zuführen.

Das Proteasom ist ein regulierter, Kern- und Zytosol-lokalisierter Komplex mit Proteaseaktivität, der u.a. Ubiquitin-markierte Proteine degradiert. Für den Prozess der Ubiquitin-Markierung sind immer mehrere Enzyme notwendig: E1, das Ubiquitin aktivierende Enzym (in *S. cerevisiae* nur Uba1), welches Ubiquitin mit ATP aktiviert und nach Ausbildung einer Thioesterbindung auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) überträgt. Von diesem wird das Ubiquitin direkt oder indirekt durch die Aktivität einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) auf das abzubauen Substrat übertragen und eine Polyubiquitinkette aufgebaut. Weitere beteiligte Enzyme sind E4-Ligasen zur weiteren Polyubiquitinierung, Deubiquitinierungsenzyme und im weitesten Sinne auch alle Transportproteine, die die Substrate zum Proteasom bringen (Übersicht in: Hilt and Wolf, 2004).

Der mit der ER-Qualitätskontrolle verknüpfte Abbauweg von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasomsystem wird als ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) bezeichnet.

Inzwischen wurde eine Vielzahl an Komponenten des ERAD entdeckt (Abb. 3). Diese wurden u.a. in genomweiten Suchen in Hefezellen gefunden (Buschhorn *et al.*, 2004; Finger *et al.*, 1993; Kohlmann *et al.*, 2008; Medicherla, 2004). Das aktuelle Modell des ERAD schlägt verschiedene Wege des Abbaus der ERAD-Substrate in Abhängigkeit von der Lokalisierung der Fehlfaltung im Substrat vor. So beschreibt das ERAD-C („cytosol“) Modell den Mechanismus für auf zytosolischer Seite erkennbare Fehlfaltungen, das ERAD-M („membrane“), wenn die Fehlfaltung im Transmembranabschnitt erscheint und das ERAD-L („lumen“) Modell gilt für Substrate mit ER-luminaler Fehlfaltung (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Vashist and Ng, 2004). ERAD-L Substrate benötigen zur Erkennung der Fehlfaltung die im ER lokalisierten Hsp70/Hsp40 Chaperone Kar2, Jem1, Scj1 und Pdi1, die putativen Lektine Yos9 und Htm1 (siehe nächster Abschnitt) und die ER-lumenale Domäne von Hrd3. Das E3 für diesen Weg ist Der3 (auch als Hrd1 bezeichnet), das durch Hrd3 stabilisiert wird. Das E2 Ubc7 wird über die Interaktion mit Cue1 an die ER-Membran gebracht. Die Ubiquitinierung erfolgt auf der zytosolischen Seite der ER-Membran. Für die Retrotranslokation ist auf der zytosolischer Seite der membrangebunde Komplex aus Cdc48, Ufd1, Npl4 und Ubx2 notwendig. Die ERAD-C Substrate werden von den Hsp70/Hsp40 Chaperonen Ssa1, Ydj1 und Hlj1 gebunden und die E3-Ligase ist Doa10; Ubc6 und Ubc7 dienen als E2-Enzyme. Auch hier ist die Retrotranslokation abhängig von dem Komplex aus Cdc48, Ufd1, Npl4 und Ubx2. Beim ERAD-M-Weg sind keine Chaperone bekannt. Möglicherweise werden Substrate mit Fehlfaltungen in dem Membranabschnitt direkt von der E3-Ligase erkannt. Alle anderen Komponenten sind identisch zu denen des ERAD-L-Wegs, mit Ausnahme von den hier im ERAD-M-Weg nicht notwendigen Komponenten Usa1 und Der1. Das Membranprotein Usa1 hilft möglicherweise den Der3-Komplex mit Der1 zu verknüpfen. Einige Substrate werden von den UBA-UBL Domänen-Proteinen Rad23 und Dsk2 zum Proteasom begleitet. Die Peptid-N-Glycanase Png1 entfernt die N-gebundenen Glykane. Ufd2 unterstützt möglicherweise die Polyubiquitinierung, während Rpn11 und/oder DUBs wie Otu1 die Deubiquitinierung der Substrate am Proteasom beschleunigen. (Übersicht in: Nakatsukasa and Brodsky, 2008).



**Abb. 3: Die Komponenten und Wege der ER assoziierten Degradation.** Abgebildet sind die Komponenten von ERAD-C, -L und -M sowie zwei Modell-Substrate: Ste6\* für den ERAD-C und CPY\* für den ERAD-L Weg. Für CPY\* ist der Verlauf des „Time-Trimming“-Modells angezeigt.

Das am besten untersuchte glykosylierte lösliche ERAD-Substrat in *S. cerevisiae* ist CPY\* (Finger *et al.*, 1993; Hiller *et al.*, 1996). Es ist eine mutierte Version der vakuolären Carboxypeptidase yscY (Prc1), die aufgrund einer Mutation von Glycin zu Arginin an Position 255 (*prc1-1*) (Finger *et al.*, 1993) nicht mehr die native Konformation im ER erreichen kann. Sie wird mit einer Halbwertszeit von 20 min abgebaut. Derivate von CPY\* sind glykosylierte membranständige ERAD-Substrate, wie z.B. CTG\* und CTL\*. Sie bestehen aus CPY\*, einer Transmembrandomäne von Pdr5 und GFP (grün fluoreszierendes Protein) bzw. einem Leu2 (Isopropylmalat-Dehydrogenase) auf der zytosolischen Seite (Medicherla *et al.*, 2004; Taxis *et al.*, 2003). CPY\* und alle Derivate sind ERAD-L-Substrate, da der mutierte Teil des Proteins sich im Lumen des ER befindet. Ein glykosyliertes, die Membran mehrfach durchspannendes Modell-Substrat ist Pdr5\* (*pdr5-26*). Dieses ERAD-M-Substrat weist in der Nähe der Membran im luminalen Teil eine Mutation auf (Plempner *et al.*, 1998). Die HMG-CoA-Reduktase Hmg2 ist ein natives ERAD-Substrat. Sie unterliegt der regulierten Proteolyse im Mevalonat-Stoffwechsel, kann allerdings mit fehlgefalteter Membrandomäne

mit Farnesol zum reinen ERAD-M-Substrat werden (Gardner and Hampton, 1999; Hampton and Bhakta, 1997; Shearer and Hampton, 2005). Das unglykosylierte Membranprotein Sec61-2 ist vermutlich ebenfalls ein Beispiel für ein Protein, das eine Fehlfaltung in der Membrandomäne ausweist, da es kaum lumenale Anteile besitzt. Es ist eine mutierte Form des Importkanals Sec61, das bei einer Temperatur von 37 °C instabil und selbst zum ERAD-Substrat wird (Biederer *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997; Sommer and Jentsch, 1993; Van den Berg *et al.*, 2004). Ein unglykosyliertes Membranprotein mit einer fehlgefalteten zytosolischen Domäne (ERAD-C) ist Ste6\*, eine mutierte Form (*ste6-166*) des  $\alpha$ -Faktor-Transporters (Huyer *et al.*, 2004). Schließlich existieren auch unglykosylierte lösliche ERAD-Modell-Substrate. Ein solches ist das Derivat von CPY\*, bei dem alle Glykosylierungsstellen so mutiert sind, dass sie nicht mehr vom OST-Komplex erkannt werden (CPY\*0000) (Knop *et al.*, 1996b). Ein weiteres unglykosyliertes lösliches Protein ist eine mutierte Version des  $\alpha$ -Faktors  $\Delta$ Gpp $\alpha$ F (oder kurz p $\alpha$ F), die allerdings *in vitro* unabhängig von Cdc48/Ufd1/Npl4 und Ubiquitinierung proteasomal abgebaut wird (Lee *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass p $\alpha$ F kein ERAD-L-Substrat mehr ist (Sayeed and Ng, 2005).

Weitere glykosylierte ERAD-Modell-Substrate sind KHN, ein lösliches, lumenales ERAD-L-Substrat mit der luminalen Domäne der Simian Virus 5 HA-Neuraminidase, das membranständige KWW mit KHN-Fusion und das ERAD-C-Substrat KWS mit einer KHN-Fusion und einer mutierten zytosolischen Domäne von Ste6-166 (Vashist and Ng, 2004)

Fehlgefaltete sekretorische Proteine werden im ER erkannt und im Zytosol proteasomal degradiert (Hiller *et al.*, 1996). Dafür müssen sie über die ER-Membran retrograd zurück ins Zytoplasma transportiert werden. Es deuten viele Experimente auf die Beteiligung des Importkanals Sec61 an einem Exportkanal hin (zusammengefasst in: Tsai *et al.*, 2002). Interaktionsstudien zeigen das Proteasom in Verbindung mit dem Sec61 Translokon *in vivo* und *in vitro* (Kalies *et al.*, 2005). Eine neue genetische Studie weist erneut auf die Rolle des Sec61 als Retrotranslokon hin (Willer *et al.*, 2008).

Es wurden auch zusätzliche Abbaumechanismen vorgeschlagen, wie fehlgefaltete sekretorische Proteine aus dem ER entfernt werden. Diese sind allerdings nur für einzelne Substrate nachgewiesen oder unter speziellen Bedingungen beschrieben worden. So wird ein von Der3, Hrd3, Der1 und Ubc7 unabhängiger Weg (HIP = „Hrd1 independent proteolysis“, Hrd1 = Der3) postuliert, der bei Überexpression der Substrate CPY\* und Sec61-2 und gleichzeitigem Ausfall von Der3 ihren Abbau über die zytosolische membranassoziierte E3-

Ligase Rsp5 und Ubc4/Ubc5 als E2's beschreibt (Haynes *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde gezeigt, dass CPY\* trotz Abwesenheit von Der3 ubiquitiniert ist und dass überexprimierte CPY\* nicht sezerniert und nicht von Proteinase A (Pep4) in der Vakuole degradiert wird (Haynes *et al.*, 2002). Vereinzelt wurden für spezielle Substrate hingegen auch vakuoläre Abbaumechanismen gefunden. Ein aus einer mutierten, thermodynamisch instabilen Form des  $\lambda$ -Repressorproteins mit der Invertase Suc2 bestehendes Fusionsprotein gelangt über seine Interaktion mit Vsp10 zur Vakuole und wird dort Proteinase A (Pep4) abhängig abgebaut (Hong *et al.*, 1996). Eine mutierte Form des  $\alpha$ -Faktor Rezeptors Ste2 wird in der Vakuole ebenfalls Pep4 abhängig degradiert (Jenness *et al.*, 1997).

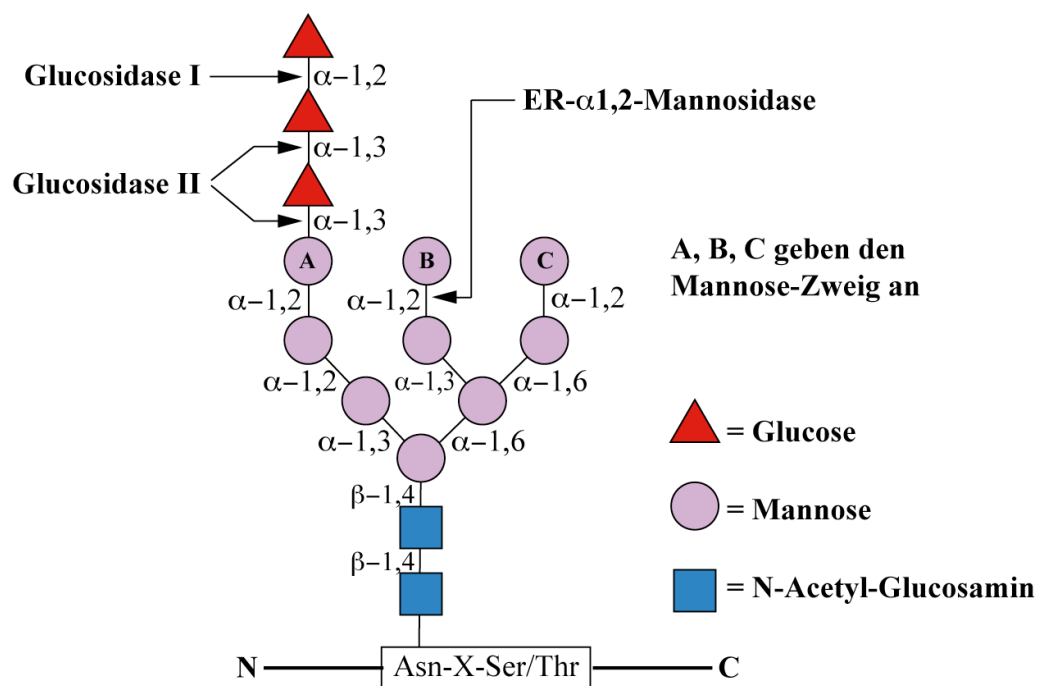
Ein mit der ER-Degradation in Verbindung stehender Schutzmechanismus der Zelle vor fehlgefalteten Proteinen im ER ist der sogenannte „Unfolded Protein Response“ (UPR). Dieser wird durch viele ungefaltete Proteine und deren Sensor, die Proteinkinase/Endoribonuklease Ire1 in der ER-Membran initiiert, indem der Transkriptionsfaktor Hac1 exprimiert wird, welcher die Expression von über 300 Proteinen induziert. Unter ihnen befinden sich Komponenten des ERAD, des ERQC, aber auch des ER-Golgi-Vesikeltransports, des Lipid- und Inositolmetabolismus und Komponenten, die für den vakuolären Proteintransport benötigt werden. Das Zusammenspiel zwischen UPR und ERAD zeigen Doppelmutationen in Zellen unter Stressbedingungen: Sie sind gegenüber Einzelmutationen synthetisch letal (Casagrande *et al.*, 2000; Cox and Walter, 1996; Fewell *et al.*, 2001; Friedländer *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 2000; Patil and Walter, 2001).

Viele Krankheiten stehen in Verbindung mit Störungen in den Mechanismen von ERQC, ERAD und UPR. Beispiele hierfür sind Diabetes, Mukoviszidose (Cystische Fibrose), die durch Abbau eines mutierten aber voll funktionsfähigen Chlorid-Transporters CFTR ausgelöst wird und neurodegenerative Erkrankungen, ausgelöst durch Proteinaggregation z.B. Creutzfeldt-Jacob-Krankheit, Alzheimer-Krankheit, Huntington-Krankheit, Parkinson-Krankheit, BSE (Harding *et al.*, 2001; Rutishauser and Spiess, 2002; Yoshida, 2007).

### **Das „Time-Trimming“-Modell**

Wie aber fällt die Entscheidung zum Abbau fehlgefalteter Proteine? Für *N*-glykosylierte sekretorische Proteine existiert das sogenannte „Time-Trimming“-Modell (Jakob *et al.*, 1998).

Es ist bekannt, dass die *N*-Glykosylierung für die ER-Proteinqualitätskontrolle notwendig ist (Hammond *et al.*, 1994). Im Säuger und in Hefe wird das gleiche Glykangrundgerüst mit der Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> während des Imports des Glykoproteins über die ER Membran an einen Asparagin-Rest innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr gebunden, (Abb. 4).



**Abb. 4: Glykangrundstruktur der *N*-Glykosylierung.**

Die Struktur der Glykane beim Import des Sekretproteins wird von drei Enzymen wieder verkürzt (Helenius and Aebi, 2001).

Während des Faltungsprozesses wird die äußere Glucose von der Glucosidase I und die zweite Glucose von der Glucosidase II entfernt. In Säugerzellen bindet dann unmittelbar eines der beiden homologen Lektine Calnexin (Membranprotein) oder Calreticulin (ER-luminales lösliches Protein) das entstandene Substrat direkt an der Glykanstruktur. An das so gebundene Glykoprotein bindet ERp57, eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase und Co-Faktor für die weiterhin ablaufende Faltung und Ausbildung von Disulfidbrücken im Protein. Dieser Komplex wird nur vorübergehend gebildet, so dass die Glucosidase II die dritte und letzte Glucose von dem Protein entfernen kann. Damit wird es zum Substrat der löslichen UDP-Glc:Glykoprotein-Glucosyltransferase (UGT), die wieder eine Glucose an die Glykanstruktur bindet, wenn das Substrat noch nicht vollständig gefaltet ist. Nun wird der Zyklus der Calnexin/Calreticulin/ERp57-Komplexbindung wiederholt (Helenius and Aebi, 2001, 2004).

Korrekt gefaltete Proteine werden nicht mehr von der UGT erfasst, der Zyklus wird also unterbrochen und die Glykoproteine werden zum Golgi weitergeleitet. Irreparabel fehlgefaltete Proteine oder Proteinuntereinheiten, die nicht mehr oligomerisieren können, werden nicht in den Golgi weitergeleitet. Experimente in Hefe mit verschiedenen Glykosylierungsmutanten (Alg-Mutanten) zeigten, dass ERAD-Substrate mit einer  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$  oder  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$  Glykanstruktur schnell degradiert werden, während andere unter-mannosylierte Glykanstrukturen nicht oder nur sehr langsam abgebaut werden (Jakob *et al.*, 1998). Die Notwendigkeit einer im ER befindlichen  $\alpha 1,2$ -Mannosidase führte zum Vorschlag folgenden Modells: Während die sekretorischen Proteine ihre Konformation einnehmen, werden alle 3 Glucose-Reste an den Glykanen entfernt. Sehr schnell wird die erste Glucose entfernt, dann entfernt die Glucosidase II mit geringerer Affinität langsam die beiden anderen Glucose-Reste. Erst dann hat eine im Vergleich zu den Glucosidasen langsamere  $\alpha 1,2$ -Mannosidase Zugriff auf die mittlere  $\alpha 1,2$ -gebundene Mannose und entfernt diese. Ein derart getrimmtes Glykan ist das Signal für den Abbau des Proteins über ERAD. Die Entscheidung, welches Protein abgebaut und welches weiter sezerniert wird, hängt also von der Zeit ab, die das Protein im ER-Lumen verweilt („Time-Trimming“-Modell) (Jakob *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 1998; Knop *et al.*, 1996b).

In der Hefe konnte ein mit dem Calnexin/Calreticulin-Zyklus vergleichbarer Mechanismus nicht gezeigt werden, eine UDP-Glc:Glykoprotein-Glucosyltransferase in Hefe wurde bisher nicht entdeckt. Cne1 ist in Hefe ein Homologes zu den Lektinen Calnexin und Calreticulin (ca. 24 % Identität), es erwies sich allerdings nicht notwendig für die Degradation des glykosylierten ERAD-Substrats CPY\* (Knop *et al.*, 1996b; Parlati *et al.*, 1995). Es könnte jedoch eine Funktion bei der Degradation unglykosylierter oder teilweise unglykosylierter Substrate haben (Kostova and Wolf, 2005; McCracken and Brodsky, 1996). Möglicherweise ist der in Säugern durch den Calnexin/Calreticulin-Zyklus „verlängerte“ Prozess der Proteinreifung notwendig, weil die durchschnittliche Größe und damit die einhergehende Komplexität der Faltung der Proteine im Säuger höher ist als in Hefe.

Unentdeckt in Hefe ist auch noch ein Analogon zu ERp57. Möglicherweise übernimmt die zu Säugern homologe Proteindisulfidisomerase Pdi1 in Hefe zusätzlich diese Aufgabe. Mögliche Kandidaten sind auch andere Thiol-Oxidoreduktasen im ER der Hefe, wie Eps1, Mpd1, Mpd2 und Eug1 (Übersicht in: Buck *et al.*, 2007).

Genomweite Analysen lieferten in Säugerzellen drei weitere ER lokalisierte  $\alpha 1,2$ -Mannosidase I homologe Proteine, mit einer 35 %igen identischen katalytischen

Mannosidasedomäne (EDEM1, -2,-3; EDEM = ER-degradation-enhancing-mannosidase-like-protein). In den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* wurde eine solche identifiziert (Htm1 = homolog to mannosidase, bzw. Mnl1 = mannosidase like protein) (Hirao *et al.*, 2006; Hosokawa *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2001; Mast *et al.*, 2005; Nakatsukasa *et al.*, 2001; Olivari *et al.*, 2005). EDEMs sind lösliche ER lumenale Proteine (Oda *et al.*, 2003; Zuber *et al.*, 2007). Die Überexpression von EDEM in Säugerzellen beschleunigt die Degradation von ERAD-Substraten (Hosokawa *et al.*, 2001), während eine Reduzierung des Expressionslevels mit RNA-Interferenz zu einer Degradationsreduktion führte (Molinari *et al.*, 2003). In den Hefen fehlen vergleichbare Htm1-Überexpressionsexperimente, aber Null-Mutanten führen zur starken Verlangsamung des ERAD (siehe unten). Man vermutet, dass die EDEMs Lektine sind, die ERAD-Substrate aktiv aus dem Calnexin/Calreticulin-Zyklus herausziehen. Denn in den katalytischen Mannosidase-Domänen fehlt eine spezielle Disulfid-Bindung, die für die hydrolytische Funktion notwendig ist (Jakob *et al.*, 2001). Dennoch zeigt EDEM3 Mannosidaseaktivität (Hirao *et al.*, 2006).

Die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen in Hefe und beim Mensch sind nicht so spezifisch wie ursprünglich angenommen. *In vitro* prozessieren beide, die humane ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase I und das in Hefe homologe Mns1 nach längerer Inkubation Strukturen von GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub> (Herscovics *et al.*, 2002). In Säugerzellen wurde *in vivo* gezeigt, dass alle Strukturen von GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> bis GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> gefunden werden können, wenn die Verweildauer von ERAD-Substraten im ER artifiziell erhöht wird (Bischoff and Kornfeld, 1986; Frenkel *et al.*, 2003; Weng and Spiro, 1993)

In Säugerzellen findet man drei weitere  $\alpha$ -Mannosidaseaktivitäten im *cis*-Golgi-Apparat, die in Hefe bisher nicht gefunden wurden und GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> zu GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> prozessieren (Lal *et al.*, 1998; Tremblay and Herscovics, 2000). Zudem wird als sicher angenommen, dass ERAD-Substrate sowohl in Säugern als auch in Hefe zwischen ER und Golgi hin und her pendeln, bevor sie degradiert werden (Hammond and Helenius, 1994; Hosokawa *et al.*, 2007; Kincaid and Cooper, 2006; Taxis *et al.*, 2002; Vashist *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001).

Es ist deshalb durchaus möglich, dass andere Strukturen als GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> für den Abbau im ERQC und ERAD eine Rolle spielen. Dennoch muss es für das „Time-Trimming“-Modell Zucker-bindende Proteine (Lektine) geben, die den Status der Oligosaccharidstruktur im ER unterscheiden können und dieses Signal an das ERAD weiter geben. Im ER wurden zwei weitere potentielle Lektine identifiziert: Yos9 (homolog zu *hOS9*) und Htm1 (homolog zu EDEM) (Buschhorn *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 2001; Nakatsukasa *et al.*, 2001).



## **Yos9 im „Gatekeeper“-Komplex**

Das Glykoprotein Yos9 (29,0 % identisch zu *hXTP3-B*, und 26,4 % identisch zu *hOS-9*, „Yeast Osteosarkom 9“) besteht aus 542 Aminosäuren mit 4 Glykosylierungskonsensussequenzen (N-X-S/T), hat eine ER-Import-Signalsequenz am *N*-Terminus und eine HDEL-Sequenz (Rücktransportsignal aus dem Golgi) am *C*-Terminus. Yos9 wird im Rahmen fluorezenzmikroskopischer Untersuchungen nur im ER gefunden (Friedmann *et al.*, 2002). Es ist nicht für den Transport von korrekt gefalteten sekretorischen Proteinen wie CPY oder Invertase notwendig und eine Deletion im Genom löst nicht den UPR aus (Friedmann *et al.*, 2002). In der Sequenz von Yos9 findet man eine Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Homologie (= MRH), wodurch eine *N*-Glykan bindende Funktion postuliert wurde (Munro, 2001)

Yos9 konnte als Komponente des ERADs identifiziert werden (Buschhorn *et al.*, 2004). Hier zeigte sich, dass in einem Deletionsstamm lösliche glykosylierte Substrate (CPY\*) sowie membranständige glykosylierte Substrate (CTG\*) stark verzögert degradiert werden. Auf den Abbau unglykosylierter Substrate wie z.B. Sec61-2 zeigte eine Deletion von *YOS9* keinerlei Auswirkung.

Im Laufe dieser Arbeit erschienen weitere Publikationen anderer Gruppen, die wie die eigenen Arbeiten, auf Yos9 als ein gesuchtes „Time-Trimming“-Lektin im ERAD-L Weg hin deuten (Bhamidipati *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Kanehara *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005; Szathmary *et al.*, 2005). So zeigen Immunopräzipitationsexperimente *in vivo* einen großen Komplex um die E3-Ligase Der3, bestehend aus Cdc48, Ubx2, Usa1, Der1, Der3, Hrd3, Kar2, Yos9 (Bhamidipati *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Gauss *et al.*, 2006b). Bekannt war bisher nur, dass Hrd3 mit Der3 stöchiometrisch gebunden ist (Gardner *et al.*, 2000). In  $\Delta$ *der3* Zellen findet man immer noch einen Unterkomplex aus Kar2/Hrd3/Yos9 und in  $\Delta$ *hrd3* Zellen eine Bindung zwischen Kar2 und Yos9 (Denic *et al.*, 2006). Yos9 bindet glykosylierte ERAD-Substrate mit der Glykan-Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> und GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>, aber nicht GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>6</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub> oder GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> (Szathmary *et al.*, 2005). Überraschenderweise bindet Yos9 allerdings auch das unglykosylierte Glykoprotein CPY\*0000. Eine mutierte Version von Yos9, R200A, bei der eine konservierte Mannose-bindende Aminosäure (Asparagin auf Position 200) gegen eine nicht Mannose bindende Aminosäure (Alanin) getauscht ist, bindet sogar mehr CPY\* und CPY\*0000. Trotzdem ist der Abbau von CPY\* in dieser Mutante (R200A) stark verzögert, vergleichbar mit dem CPY\*-Abbau in  $\Delta$ *yos9*-Zellen oder vergleichbar mit dem Abbau von CPY\*0000 in WT-Zellen (Bhamidipati *et al.*, 2005; Denic

*et al.*, 2006). Man vermutet deshalb, dass Yos9 als „Wächter“ (*engl.* Gatekeeper) vor der endgültigen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation fehlgefalteter Substrate prüft, ob der korrekte Glykan-Status (eben  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ ) vorhanden ist und nennt den Komplex aus Yos9, Hrd3 und Kar2 auch „Gatekeeper“-Komplex oder Überwachungskomplex. Diese These wird durch Der3-Überexpression-Experimente gestützt, in denen Deletionen von *YOS9* oder *HRD3* partiell kompensiert werden und sogar CPY\*0000 schneller degradiert wird als in WT-Zellen (Denic *et al.*, 2006). Yos9 und Hrd3 beschleunigen die Entfernung potentiell schädlicher fehlgefalteter Proteine, aber eventuell erhöhen sie auch die Selektivität.

Experimente mit dem humanen Homologen OS-9 bestätigen zum Teil diese Ergebnisse. So führt eine Deletion in *OS-9* ebenfalls zur Stabilisierung von glykosylierten ERAD-Substraten und eine analoge OS-9 Mutante R188A ebenfalls, auch unter weiterhin beobachtbarer Bindung zum Substrat (Bernasconi *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2008; Hosokawa *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass *hOS-9* an zwei Stellen des Substrats bindet: an eine peptidische Domäne und an den Kohlenhydraten. In einer Studie mit humanem SEL1, dem Homologen zu Hrd3, ist die MRH-Domäne in OS-9 nur notwendig zur Bindung an SEL1 (Christianson *et al.*, 2008). Das steht im Widerspruch zu neueren Studien, die Co-Immunopräzipitationen mit SEL1 und OS-9 Mutante R188A zeigen (Hosokawa *et al.*, 2009). Letzteres Ergebnis wird auch durch Studien in Hefe gestützt. Hier wurde in Bindungsstudien mit teilweise verkürzten Varianten von Hrd3 und Yos9 gezeigt, dass Yos9 mit einer der MRH benachbarten Region am luminalen Teil von Hrd3 in der Nähe der Transmembrandomäne bindet (Gauss *et al.*, 2006a). Interessant sind die Bindungsstudien *in vitro* von Hosokawa *et al.*, 2009 mit dem humanen Homologen OS-9 in Abhängigkeit zum Glykan-Status der ERAD-Substrate. Hiernach bindet *hOS-9* ausschließlich Substrate mit Glykanen, die eine Mannose weniger am C-Zweig aufweisen (vgl. Abb. 4).

### ***Htm1, das Hefe-EDEM?***

Htm1, auch Mnl1 genannt, ist ein 796 Aminosäuren großes Protein mit einer ER-Signalsequenz (ER-Import Signal) am N-Terminus und fünf Glykosylierungskonsensussequenzen (N-X-S/T). Seine Sequenz zeigt eine ca. 25 %ige Identität und eine ca. 40 %ige Ähnlichkeit mit der ER-1,2 $\alpha$ -Mannosidase (Mns1). Mit den Säuger-EDEMs teilt Htm1 eine Identität zwischen 35 % und 40 %. In der C-terminalen Sequenz befindet sich kein K/HDEL-Motiv welches als Rücktransportsignal aus dem Golgi wirken könnte. Dennoch

findet man überexprimiertes Htm1 in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ausschließlich im ER (Nakatsukasa *et al.*, 2001).

Eine Vielzahl von Experimenten mit den unterschiedlichsten ERAD-Substraten bestätigen, dass Htm1 ausschließlich die ER-abhängige Degradation von glykosylierten ERAD-L-Substraten beeinflusst: Eine Deletion reduziert die Abbaurate von CPY\*, KHN, KWW, Pdr5\*, CFTR und PrA\*, stoppt sie aber nicht vollständig. Hingegen konnte im Vergleich zum WT kein Unterschied in der Abbaurate von CPY\*0000, KWS, Sec61-2 und  $\Delta$ Gp $\alpha$ F, alles Substrate, die keine Glykosylierung tragen, gefunden werden (Gnann *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Kostova and Wolf, 2005; Nakatsukasa *et al.*, 2001; Spear and Ng, 2005; Vashist and Ng, 2004)

Htm1 hat eine zur 1,2 $\alpha$ -Mannosidase (Mns1) homologe Domäne, die viele konservierte Aminosäuren enthält, die sich in Mns1 wiederfinden. Dazu gehören diejenigen, die für die Oligosaccharidbindung, die Hydrolyse aktiven Aminosäuren und diejenigen Aminosäuren, die der Ca<sup>2+</sup> Koordination dienen. Es fehlen aber in Htm1 zwei Cysteinreste, die in der Position 340 bzw. 385 von Mns1 sind (Jakob *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wird auch eine fehlende Mannosidaseaktivität von Htm1 auf Grund von HPLC-Untersuchungen mit Peptid-N-Glykosidase F abgetrennten und <sup>3</sup>H-markierten Glykanen von CPY\* konstatiert: in  $\Delta$ htm1-Zellen wurde wie in ET-Zellen die Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> gefunden, in  $\Delta$ mns1-Mutanten aber ausschließlich GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>. Das führte zu der Vermutung, dass Htm1 ein Lektin ist (Jakob *et al.*, 2001).

Die Doppeldeletion von *HTM1* und *YOS9* zeigte keine weitere Stabilisierung von CPY\* im Vergleich zu den jeweiligen Einzeldelationen in den Zellen. Interpretiert wird diese Beobachtung damit, dass beide Proteine im gleichen Prozessweg beteiligt sind und dort nicht die gleiche Funktion haben (Buschhorn *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Szathmary *et al.*, 2005). Bei Immunopräzipitationsversuchen mit chromosomal exprimiertem Hrd3-HA wird kein Htm1 (Myc getagged) gefunden. Ebenso wird umgekehrt, wenn an Htm1-Myc mit Antikörpern gezogen wird, weder Hrd3 (HA getagged) gefunden, noch die Ligase Der3 (Gauss *et al.*, 2006a). Bei den Präzipitationen mit Yos9-FLAG und anschließender massenspektroskopischer Identifikation des „Gatekeeper“-Komplexes (Yos9, Hrd3 und Kar2, s.o.) konnte Htm1 ebenfalls nicht gefunden werden (Denic *et al.*, 2006). Einen Htm1-Yos9-Komplex unter milden Solubilisierungsbedingungen zu isolieren und über „blue native“ PAGE aufzutrennen, gelang nicht (Szathmary *et al.*, 2005).

Htm1 wird aber dennoch für eine effektive Bindung von Yos9 an seine Substrate benötigt. So wird bei Immunopräzipitationen in  $\Delta$ htm1-Zellen die Yos9-CPY\*-Bindung um ca. 50 %

reduziert (Szathmary *et al.*, 2005). Auch andere Studien zeigen keinen Verlust der Bindung Yos9-CPY\* in  $\Delta htm1$ -Zellen (Bhamidipati *et al.*, 2005; Denic *et al.*, 2006).

Eventuell führt der Verlust von Htm1 nicht mehr zum Rückhalt von ERAD-Substraten im ER durch ER lumenale ERAD Komponenten. Im *HTM1*-Deletionsstamm findet man in einem Experiment die ER lumenale Form der CPY\* (p1CPY\*) höhermolekular im Golgi, was mit einem speziell gegen CPY\* mit  $\alpha$ 1,6-gebundenen Mannosen gerichteten Antikörpern gezeigt wurde (Nakatsukasa *et al.*, 2001).

Eine interessante Beobachtung konnte bei der Untersuchung der Glykane im Hinblick auf die Positionen im Protein in den mehrfach glykosylierten ERAD-Substraten CPY\* und PrA\* gemacht werden (Kostova and Wolf, 2005; Spear and Ng, 2005). Hier wurde gezeigt, dass für die schnelle Degradation in WT-Zellen bei der vierfach glykosylierten CPY\* ausschließlich die letzte C-terminale Glykosylierungsstelle entscheidend ist und bei der zwei-fach glykosylierten PrA\* die erste Glykosylierungsstelle am N-terminalen Ende. Eine *HTM1*-Deletion führt bei der vollständig deglykosylierten CPY\*0000 zu keiner Stabilisierung. Ist hingegen noch irgendein Glykan vorhanden, so verlangsamt sich die Abbaurate um das zwei-fache im Vergleich zu *HTM1*-Zellen, und zwar unabhängig von der Position des Kohlehydratrestes (hier gezeigt: CPY\*0001, 0011, 1100 und 1110) (Kostova and Wolf, 2005). Im Falle von CPY\*1110 konnte die zwei-fache Stabilisierung in  $\Delta htm1$ -Zellen durch eine andere Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Spear and Ng, 2005). Die *HTM1*-Deletion hat auch auf den Abbau des ebenfalls löslichen, mutierten und unglykosylierten Pro- $\alpha$ -Faktors (p $\alpha$ F) keinen Einfluss (Sayeed and Ng, 2005).

Neue Hinweise zu Htm1 versprechen zahlreiche Daten zu den Säuger-homologen EDEMs. Hier gibt es drei verschiedene Proteine (EDEM1, -2, -3) wie in zwei verschiedenen Modellorganismen, Mensch und Maus festgestellt wurde. Die drei EDEM Proteine zeigen eine über 90 %ige Identität im Sequenzvergleich (siehe Übersicht in: Kanehara *et al.*, 2007). Die Überexpression von EDEM1 beschleunigt den Abbau des glykosylierten ERAD-Substrats NHK, eine mutierte Variante von  $\alpha$ 1-Antitrypsin. EDEM1 lässt sich mit seinem Substrat immunopräzipitieren und verhindert eine Glucose-Addition durch die UDP-Glc:Glykoprotein-Glucosyltransferase (UGT) (Hosokawa *et al.*, 2001; Molinari *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2003). EDEM1 und EDEM2 haben dieselben Substrate. Von beiden konnte weder *in vivo* noch *in vitro* eine Mannosidase-Aktivität nachgewiesen werden (Molinari *et al.*, 2003; Olivari *et al.*, 2005). Möglicherweise hat aber EDEM3 eine solche Mannosidase-Aktivität. Es zeigt bei Überexpression nicht nur den gleichen beschleunigten Abbau von NHK, es werden auch die Glykanstrukturen GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>6</sub> und GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> erzeugt (Frenkel

*et al.*, 2003; Hirao *et al.*, 2006). Alle EDEM Proteine werden während des „Unfolded Protein Response“ (UPR) stärker exprimiert, die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase I dagegen nicht (Hosokawa *et al.*, 2001). Diese Daten zusammengenommen lassen vermuten, dass die EDEM Proteine bei ER-Stress aktiv werden, die Glykanstrukturen so kürzen, dass eine Re-Glykosylierung durch die UDP-Glc:Glykoprotein-Glucosyltransferase (UGT) nicht mehr möglich ist um das ER schnell vor zuviel ungefalteten Proteinen schützen (Olivari *et al.*, 2005).

Ein direkter Vergleich der EDEM Proteine des Säugers und Htm1 der Hefe ist schwierig. In Hefe wurde bisher kein Calnexin/Calreticulin-Zyklus nachgewiesen und Htm1 ist auch kein Ziel des UPR (Travers *et al.*, 2000).

## **Usa1**

Usa1 ist ein 838 Aminosäuren großes Protein, besitzt eine Ubiquitin-ähnliche Domäne in Position 259-318 und zwei potentielle Transmembrandomänen mit *N*- und *C*-Terminus im Zytosol. Es wird im Rahmen des UPR stärker exprimiert (Awasthi *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2006).

In *in vivo* Immunopräzipitationsexperimenten findet man Usa1 als Bestandteil des großen Komplexes bestehend aus der E3-Ligase Der3, Cdc48, Ubx2, Der1, Hrd3, Kar2 und Yos9 (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006). Dabei bindet Der3-TAP Usa1 genauso wie umgekehrt Usa1-TAP den Der3-Komplex. In einem *DER1* Deletionsstamm bleibt die Bindung zwischen Der3 und Usa1 erhalten, aber umgekehrt geht in einem *USA1* Deletionsstamm die Bindung zwischen Der3 und Der1 verloren. Deshalb vermutet man, dass Usa1 die Aufgabe hat, Der1 mit Der3 zu verbinden (Carvalho *et al.*, 2006). ERAD-L-Substrate wie KHN, KWW und CPY\* werden in  $\Delta$ *usa1*-Zellen nur stark verzögert abgebaut, aber die Degradation des ERAD-C-Substrates Ste6-166 als auch der ERAD-M-Substrate Hmg2, Sec61-2 und Pdr5\* bleibt unbeeinflusst (Carvalho *et al.*, 2006). Usa1 lässt sich sowohl mit CPY\* als auch mit CPY\*0000 co-immunopräzipitieren (Denic *et al.*, 2006)

In unserem Institut wurde im Rahmen genomweiter Studien mit den Substraten CTL\* (bestehend aus ER luminalem CPY\*, einer Transmembrandomäne von Pdr5 und Leu2 auf zytosolischer Seite) und mit Sec61-2-Leu2 (bestehend aus mutiertem Sec61 und Leu2 auf zytosolischer Seite) nach ERAD-Komponenten gesucht und unter anderem Usa1 identifiziert (Kohlmann, 2007; Medicherla, 2004). Weiterführende Pulse-Chase- und Cycloheximid-

Experimente zeigten, dass in  $\Delta usal$ -Zellen CPY\* und CTL\*-Myc stabilisiert sind, aber nicht CTG\* (bestehend aus CPY\*, einer Transmembrandomäne von Pdr5 und GFP = grün fluoreszierendes Protein auf zytosolischer Seite) (Hisachi Hoshida, mündliche Mitteilung).

## **Aufgabenstellung**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen tieferen Einblick in die im ER stattfindende Erkennung und Degradation von irreversibel fehlgefalteten sekretorischen Proteinen zu erhalten.

Für die Degradation von unglykosylierten, missgefalteten sekretorischen Proteinen sind keine Lektine des ER notwendig. Es war die Frage zu klären, ob der Abbau von unglykosylierten Substraten überhaupt von bekannten Komponenten des ERAD abhängig ist. Pulse-Chase-Analysen mit dem vollständig unglykosylierten CPY\*0000 in Abhängigkeit von verschiedenen Schlüsselkomponenten der Proteindegradation sollten hierüber Aufschluss geben.

Für die Degradation von glykosylierten, missgefalteten sekretorischen Proteinen ist der Glykan-Status entscheidend. Diesen Status können Lektine überprüfen. Deshalb sollten die beiden potentiellen Lektine des ER, Yos9 und Htm1, auf mögliche Bindungspartner *in vivo* untersucht werden.

Htm1 könnte eine andere Funktion als die eines reinen Lektins haben. Dieser Frage sollte nachgegangen werden.

Die Funktion von Usa1 im ERAD ist in Hinblick auf seine Substratspezifität widersprüchlich. Deshalb soll im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von T. Sommer, MDC Berlin, der Abbau von CTG\* in Stämmen mit verschiedenen genetischem Hintergrund untersucht werden.

# Material und Methoden

## *Verbrauchsmaterial und Geräte*

### **Chemikalien, Medien und Enzyme**

**Amersham**, Little Chalfont, UK: ECL<sup>TM</sup>-System, ECL-Filme, Protein A Sepharose<sup>TM</sup> CL-4B

**BIO-RAD**, Hercules, USA: Precision Protein<sup>TM</sup> Standards, All Blue

**Difco**, Detroit, USA: Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids

**Fermentas**, St. Leon-Rot: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus, Restriktionsenzyme

**Hartmann Analytic GmbH**, Braunschweig: <sup>35</sup>S-Methionin

**Invitrogen**, Carlsbad, USA: T4-Ligase

**Merck**, Darmstadt: Calbiochem Protein A/G-Sepharose

**Machery-Nagel**, Düren: NucleoSpin Plasmid Kit

**New England BioLabs**, Ipswich, USA: Restriktionsenzyme und zugehörige Inkubationspuffer, Polymerasen

**peQLab**, Erlangen: Plasmid Minipre Kit, Gel Extraction Kit, Cycle-Pure Kit

**Pierce**, Rockford, USA: ECL<sup>TM</sup>-System

**Qiagen**, Hilden: QIAprep<sup>TM</sup> Spin Minipre Kit, QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit

**Roche**, Basel, Schweiz: T4 DNA-Ligase, Desoxyribonucleosidtriphosphate, DNA-Längenstandard, RNase A, Ampicillin, Complete<sup>TM</sup> Proteaseinhibitor, Restriktionsenzyme und zugehörige Inkubationspuffer

**Roth**, Karlsruhe: 1kb DNA-Leiter

**Schleicher & Schuell**, Dassel: Blottingpapier, Nitrocellulosemembranen

**Sigma**, Steinheim: Aminosäuren und Nucleinbasen, Cycloheximid, Proteaseinhibitoren,

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

### **Geräte**

**Amersham-Pharmacia Biosciences, Little Chalfont, UK:** Spektrometer

**Beckmann, Fullerton, USA:** Optima<sup>TM</sup> TLX Ultrazentrifuge

**Bio-RAD, Hercules, USA:** DNA- und Protein-Gelkammern



**Biometra, Göttingen:** Thermocycler

**Eppendorf, Hamburg:** Tischzentrifugen, Thermomixer

**Hereaus, Hanau:** Tischzentrifugen

**ITF Labortechnik, Wasserburg; LTF / Fröbel, Wasserburg:** Semi Dry Blotting-Apparaturen

**Kontron, Neufarn/München:** Kühlzentrifugen

**Molecular Probes Inc., Eugene, USA:** PhosphoImager

**Rainin Instruments Co. Inc., Leiden, NL:** Mikromanipulator

**Stratagene, La Jolla, CA, USA:** Robocycler Gradient 40

## Antikörper

Antikörper	Verwendung	Bezeichnung	Herkunft
Kninchen $\alpha$ Cdc48	1:10.000 verdünnt in immunologischer Detektion		T. Sommer, MDC Berlin
Kaninchen $\alpha$ CPY	5 $\mu$ l in Pulse-Chase Analyse	200-401-135 Lot# 12142	Rockland
Maus $\alpha$ CPY	1:10.000 verdünnt in immunologischer Detektion		Dianova
Kaninchen $\alpha$ Der3	1:2.500 verdünnt in immunologischer Detektion		(Bordallo <i>et al.</i> , 1998)
Kaninchen $\alpha$ FLAG	6 $\mu$ l in Immunopräzipitation	F7425 Lot# 026K4848	Sigma
Kaninchen $\alpha$ FLAG	1:5.000 verdünnt in immunologischer Detektion	F7425 Lot# 026K4848	Sigma
Maus $\alpha$ HA	5 $\mu$ l in Immunopräzipitation	MMS-101 Clone 16B12	Covance (BAbCO)
Maus $\alpha$ HA	1:5.000 verdünnt in immunologischer Detektion	MMS-101 Clone 16B12	Covance (BAbCO)

Ziege $\alpha$ Kaninchen	1:10.000 verdünnt in immunologischer Detektion	Code: L42007	Caltag Laboratories
Kaninchen $\alpha$ Kar2	1:5.000 verdünnt in immunologischer Detektion		Peter Walter
Ziege $\alpha$ Maus	1:10.000 verdünnt in immunologischer Detektion	Code: 115-035-116 Lot: 58307	Jackson ImmunoResearch
Maus $\alpha$ Myc	6 $\mu$ l in Immunopräzipitation	Sc-40 Clone 9E10	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus $\alpha$ Myc	1:5.000 verdünnt in immunologischer Detektion	Sc-40 Clone 9E10	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
$\alpha$ PGK	1:10.000 verdünnt in immunologischer Detektion	A6457 Clone 22C5	Molecular Probes
Kaninchen $\alpha$ Sec61	1:10.000 verdünnt in immunologischer Detektion		T. Sommer, MDC Berlin

## Peptide

Peptid	Verwendung	Bezeichnung	Herkunft
3 x HA	1.000 $\mu$ g/ml Verdünnung als Elution in Immunopräzipitation	I2149	Sigma
3 x FLAG	200 $\mu$ g/ml Verdünnung als Elution in Immunopräzipitation	F4799	Sigma

c-Myc	1.000 µg/ml Verdünnung als Elution in Immunopräzipitation	M 2435	Sigma
-------	--	--------	-------

## Übersicht der verwendeten Stämme

### Saccharomyces cerevisiae-Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
W303-1B	Mat $\alpha$ <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	(Chiang and Schekman, 1991)
W303-1Ca	Mata <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 prc1-1</i>	(Knop <i>et al.</i> , 1996a)
W303-1C $\alpha$	Mat $\alpha$ <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 prc1-1</i>	(Knop <i>et al.</i> , 1996a)
W303 $\Delta$ C	W303-1B Mata oder Mat $\alpha$ <i>prc1::LEU2</i>	(Plempner <i>et al.</i> , 1999b)
W303-CM	W303-1C Mat $\alpha$ <i>mns1::URA3</i>	(Knop <i>et al.</i> , 1996b)
YBB1	W303 $\Delta$ C Mata <i><math>\Delta</math>htm1::kanMX4 <math>\Delta</math>vos9::His3MX6</i>	(Buschhorn <i>et al.</i> , 2004)
YBB9	W303 $\Delta$ C Mat $\alpha$ <i><math>\Delta</math>vos9::His3MX6</i>	(Buschhorn <i>et al.</i> , 2004)
YOF21	W303 $\Delta$ C Mata <i>YOS9-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YOF27	W303 $\Delta$ C Mata <i>YOS9-3HA::kanMX6 HTM1-13Myc::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YOF31	W303 $\Delta$ C Mata <i>HTM1-13Myc::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YOF46	W303 $\Delta$ C Mat $\alpha$ <i>HTM1-13Myc::HIS3MX6 <math>\Delta</math>vos9::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YOF49	YOF46 <i><math>\Delta</math>hrd3::loxP-URA3-loxP</i>	diese Arbeit
YOF53	YOF46 <i><math>\Delta</math>hrd3</i>	diese Arbeit
YOF67	W303-1C Mata <i><math>\Delta</math>htm1::kanMX4 mns1::URA3</i>	diese Arbeit
YOF70	W303-1C Mata <i><math>\Delta</math>htm1::kanMX4</i>	diese Arbeit

YOF81	YOF70 <i>MNS1-3HA::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YOF82	W303-1C <i>Mat<math>\alpha</math> HTM1-13Myc::HIS3MX6 mns1::URA3</i>	diese Arbeit
YOF84	W303 $\Delta$ C <i>HTM1-13Myc::HIS3MX6 <math>\Delta</math>vos9::His3MX6</i> <i>MNS1-3HA::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
YOF85	W303-1C <i>HTM1-13Myc::HIS3MX6 <math>\Delta</math>vos9::His3MX6</i> <i>MNS1-3HA::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
CB018	W303-1B <i>Mat<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>pep4::HIS3 <math>\Delta</math>prb1::hisG <math>\Delta</math>prc1::hisG</i>	Fuller und Kuchler, K.
YHI29-14	WCG4Ya <i>pre1-1 pre4-1 prc1-1</i>	W. Hilt
YJB009	W303 1C <i><math>\Delta</math>der3/hrd1</i>	(Bordallo <i>et al.</i> , 1998)
YTX140	DF5 <i>trp1-1(am), his3-<math>\Delta</math>200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -</i> <i>112 prc1-1</i>	E. Jarosch
YSH029	DF5 <i>trp1-1(am), his3-<math>\Delta</math>200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -</i> <i>112 prc1-1 <math>\Delta</math>usal::TRP1</i>	E. Jarosch
BS684a	W303 <i>Mat<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>his1</i>	Singer-Krüger
BS684 $\alpha$	W303 <i>Mat<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>his1</i>	Singer-Krüger

### **Escherichia coli-Stamm**

<b>Name</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 recA1 gyrA96 thi $\Delta$ 1 (lacZYAargF) U169 (80dlacZM15) I <sup>-</sup> hsdR17 (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) supE44 (Nal <sup>r</sup> ) rel A1	(Hanahan, 1983)

### **Plasmide**

<b>Name</b>	<b>Genotyp/Verwendung</b>	<b>Herkunft</b>
pFA6a-3HA-kanMX6	<i>E. coli</i> Plasmid zur 3xHA Markierung mit <i>KAN<sup>R</sup></i>	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
pFA6a-13Myc-His3MX6	<i>E. coli</i> Plasmid zur 13xMyc Markierung mit <i>HIS5<sup>+</sup></i>	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
pUG72	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>loxP-URA3-loxP</i> Sequenz	(Güldener <i>et al.</i> , 2002)

pSH63	<i>CEN TRP1</i> Vektor für Hefe und <i>E. coli</i> (amp <sup>R</sup> ) p414 <i>GAL1-Cre</i>	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)
pYM2	<i>E. coli</i> Plasmid zur 3xHA Markierung mit <i>HIS3MX6</i>	(Knop <i>et al.</i> , 1999)
Zkb75	pRS316 <i>prc1-1</i> ,0000	N. Hauser (1995) subkloniert in pRS316 durch Z. Kostova
pHIT341	pRS316 <i>prc1-1</i>	R. Hitt, 2003
pCTG*	pRS316 CTG* unter <i>PRC1</i> -Promotor	(Taxis <i>et al.</i> , 2003) (Subkloniert in pRS316 durch Z. Kostova)
pRS314	<i>CEN/ARS TRP1</i> (amp <sup>R</sup> )	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS424	<i>2μ/ARS TRP1</i> (amp <sup>R</sup> )	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)
pRS315-Yos9-FLAG	<i>CEN/ARS LEU2</i> mit <i>YOS9-3FLAG</i> Sequenz	(Denic <i>et al.</i> , 2006)
pOF31	pRS314 <i>YOS9-3FLAG</i>	diese Arbeit
pOF37	pRS314 mit der Sequenz <i>P<sub>HTMI</sub>HTMI-13MycT<sub>ADHI</sub></i>	diese Arbeit
pOF41	pRS424 mit der Sequenz <i>P<sub>HTMI</sub>HTMI-13MycT<sub>ADHI</sub></i>	diese Arbeit
p3MNS1HA	pRS314 mit der Sequenz <i>P<sub>MNS1</sub>MNS1-3HAT<sub>ADHI</sub></i>	Otte, K. und Stolz, A.
p4MNS1HA	pRS424 mit der Sequenz <i>P<sub>MNS1</sub>MNS1-3HAT<sub>ADHI</sub></i>	Otte, K. und Stolz, A.

## Synthetische Oligonukleotide

Alle Sequenzangaben in 5'- zu 3'-Orientierung

5'YOS9HA	AACGTAGCAGCTGGTGTTTTCATCGAACATGATGAGCTTC GGATCCCCGGGTTAATTAA
3'YOS9HA	GAGTTGTTCTATTCGTAAGAACTGTTTATAGAATACTCTGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC
5'KAN	TAATGTCGGGCAATCAGGTG
YOS9down	GGTACAATGTCTTTTGTACTCCC

5'HTM1TagLongtineF	ATGTTAGAATGCACGCCCATCATCAACTTATTTATTGTACG GATCCCCGGGTTAATTAA
3'HTM1TagLongtineR	TTATGTAAAAGCTGTAGAGGTCTATCTAAAAGAGTGATTG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
5'HIS	AAACTGTTTCAGGAGCGCAAG
HTM1down	CGACCAGCGAAATGGATGAGC
5'BamHIyos9	GCACGGATCCGTAACATTCCCATCGGA
3'HIS	GTGATACGGGAGATAAACGC
5'HTM1Mitte	ACGATTTAAGTCTAACTGCG
5'hrd3Gueld	ACCGTGACTCTTTAACCCTGCCGAATATTATAAGCAA ACT CAGCTGAAGCTTCGTACGC
3'hrd3Gueld	TCTATGGATAGTCTATGTATATATCTATACAAACCACA GCATAGGCCACTAGTGGATCTG
5'HRD3Prom	TTGTTAGCAACTGGTACAGG
3'HRD3Term	ATGAACGGCAATTTGAGACC
5'hrd3prom	ACGTTGCCAAATCGCTGACC
5'MNS1HAKnop	GAAGAAATATTTAAAATCGCAGTCTCTGACCACAGGTTGGT CGTTG CGTACGCTGCAGGTCGAC
3'MNS1HAKnop	AGTGAATTTTAAAAGGCGAATCTGGCCACTATATAGCACA CTAACATCGATGAATTCGAGCTCG
Htm1a2	ATGGGCCCTCGAGATCAACATACGGTCCTCTAG
Htm1b2	AGTCTAGAGAGCTCAGATCTATATTACCCTGTTATCC

### **Wachstumsbedingungen von *Saccharomyces cerevisiae*- und *Escherichia coli*-Stämmen und Standardmethoden**

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*- und *E. coli*- Stämmen wurden Standardmedien verwendet. Es wurden Standardprotokolle für Restriktionen, Ligationen und Agarosegelelektrophorese verwendet (Ausubel *et al.*, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Sambrook, 1989). Als Methode zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Lithiumacetatmethode verwendet (Ito *et al.*, 1983).

## **Zellbiologische Methoden**

### **Paarung haploider Stämme**

Um zwei haploide Hefe (*S. cerevisiae*) -Stämme zu kreuzen, wurden diese auf YPD-Platte übereinander ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Entstehung diploider Zellen, wurde mikroskopisch anhand der Morphologie überprüft.

### **Sporulation und Tetradendisektion**

Eine kleine Menge der diploiden Zellen aus der Kreuzung wurde auf Presporulation-Platten ausgestrichen und 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Zellmasse auf Sporulations-Platten überführt und 7 Tage bei 25 °C inkubiert.

Zum partiellen Verdau des Ascus wurden die sporulierten Hefen in Oxalyticase-Lösung (2,5 % Oxalyticase, 0,6 M Sorbitol 0,05 M Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und 30 min bei 30 °C inkubiert. Gestoppt wurde der Verdauprozess mit der fünf-fachen Menge an kalten sterilen Wassers und mit einer Inkubation auf Eis.

Die Trennung der einzelnen Sporen einer Tetrade erfolgte am Mikromanipulator.

### **Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen**

Zur Bestimmung des Paarungstyps (Mata oder Mata $\alpha$ ) wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt. Die Kandidaten wurden zusammen mit je einem BS684 Stamm auf YPD gekreuzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die YPD-Platten auf CM-Platten (CM ohne Supplemente) replika-plattiert und 2 Tage bei 25 °C inkubiert. Wachstum unter diesen Bedingungen bedeutete den umgekehrten Paarungstyp zum jeweiligen BS684-Stamm.

## **Molekularbiologische Methoden**

### **Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe**

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 1 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und die Zellen mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 200  $\mu$ l „Breaking-Buffer“ (2 % Triton X-1000, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und 200  $\mu$ l Glasperlen sowie 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugeben. Dann wurde

bei 4 °C 10 min gevortext, um die Zellen aufzuschließen. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 20.000 xg wurde die wässrige Phase abgenommen, in 1 ml 100 % Ethanol überführt und 1 h bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 20.000 xg pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 400 µl Wasser (mit 30 µg RNase) gelöst und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl 3 M Ammoniumacetat und 1 ml eiskaltem Ethanol wieder bei -80 °C 1 h gefällt. Anschließend wurde erneut 10 min bei 20000 xg zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgelöst.

## **Erzeugung von Hefestämmen**

### **YOF21**

Dieser Stamm wurde nach der Methode von (Longtine *et al.*, 1998) erzeugt. Dazu wurde zunächst mittels PCR von dem Plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 und den Oligonukleotiden 5'YOS9HA und 3'YOS9HA ein 1898 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Damit wurde der Stamm W303ΔC transformiert und auf Geneticin Resistenz selektioniert (G418; 200 mg/l YPD). Die korrekte Integration der DNA-Kassette wurde mit einer PCR und den Oligonukleotiden 5'KAN und YOS9down überprüft. Eine Expressionskontrolle zeigte im Gegensatz zum W303ΔC ein Signal in der erwarteten Höhe von 75 kDa.

### **YOF27**

Aus dem Stamm YOF21 wurde YOF27 ebenfalls nach der Methode von (Longtine *et al.*, 1998) erzeugt. Dazu wurde zunächst mittels PCR von dem Plasmid pFA6a-13Myc-His3MX6 und den Oligonukleotiden 5'HTM1TagLongtineF und 3'HTM1TagLongtineR ein 2169 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Damit wurde Stamm YOF21 transformiert und auf Histidinprototrophie selektioniert. Die korrekte Integration der DNA-Kassette wurde mit einer PCR und den Oligonukleotiden 5'HIS und HTM1down überprüft. Eine Expressionskontrolle zeigte ein Signal mit Anti-Myc-Antikörper, in der Höhe von ca. 140 kDa im Vergleich zum W303ΔC.

### **YOF31**

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung erzeugt. Der Stamm YOF27 wurde mit dem Stamm W303ΔC gekreuzt und die nach Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen auf fehlende Geneticin Resistenz und vorhandene Histidinprototrophie selektioniert. Verifiziert



wurde durch eine Expressionskontrolle gegenüber dem YOF27, die eine Abwesenheit eines Yos9p-HA<sub>3</sub> Signals und die Anwesenheit des Htm1-Myc<sub>13</sub> Signals zeigte.

#### **YOF46**

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung erzeugt. Der Stamm YOF31 wurde mit dem Stamm YBB9 gekreuzt und die nach Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen auf vorhandene Histidinprototropie selektioniert. Verifiziert wurde der Stamm durch eine PCR mit den Oligonukleotiden 5'BamHIyos9 (im Promotor von *YOS9*) und 3'HIS auf die Anwesenheit der Deletionskassette  $\Delta yos9::HIS3MX6$  und mit den Oligonukleotiden 5'HTM1Mitte und 3'HIS auf die Anwesenheit von *HTM1-13Myc::HIS3MX6*. Zudem zeigte der Stamm, dass er gegenüber dem YBB1 ( $\Delta htm1$ ) das Protein Htm1-Myc<sub>13</sub> exprimiert.

#### **YOF49**

Dieser Stamm wurde durch Deletion von *HRD3* in YOF46 nach (Güldener *et al.*, 2002) erzeugt. Dazu wurde zunächst mittels PCR von dem Plasmid pUG72 unter Verwendung der Oligonukleotide 5'hrd3Gueld und 3'hrd3Gueld ein 1700 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Damit wurde der Stamm YOF46 transformiert und auf Uracilprototrophie selektioniert. Die korrekte Integration der DNA-Kassette wurde mit einer PCR und den Oligonukleotiden 5'HRD3Prom und 3'HRD3Term, sowie 5'hrd3prom und 3'HRD3Term überprüft. Zudem wurde durch eine Rückkreuzung mit dem Stamm W303 $\Delta C$  gezeigt, dass die Integrationskassette nur einmal integriert wurde.

#### **YOF53**

Dieser Stamm entstand durch das Entfernen der *URA3*-Sequenz aus YOF49 nach (Güldener *et al.*, 2002). Dazu wurde das Plasmid pSH63 in den Stamm eingeschleust, wodurch in YPG-Medium die Cre-Rekombinase exprimiert wird. Diese entfernt die zwischen ihren Erkennungssequenzen (loxP) liegende *URA3*-Sequenz aus dem Genom. Verifiziert wurde der erhaltene Stamm durch fehlende Uracilprototrophie sowie mittels PCR und den Oligonukleotiden 5'HRD3Prom und 3'HRD3Term bzw. 5'hrd3prom und 3'HRD3Term.

#### **YOF67**

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung erzeugt. Der Stamm YBB1 wurde mit dem Stamm W303-CM gekreuzt und die nach Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen auf vorhandene Uracilprototrophie, Geneticin Resistenz (G418; 200 mg/l YPD) sowie fehlende

Leucinprototrophie und Histidinprototrophie selektioniert. Zudem wurde in einer Expressionskontrolle CPY\* nachgewiesen und der Paarungstyp festgestellt.

#### **YOF70**

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung erzeugt. Der Stamm YBB1 (W303ΔC Mata  $\Delta htm1::kanMX4 \Delta yos9::His3MX6$ ) wurde mit dem Stamm W303-CM (W303-1C Mata  $mns1::URA3$ ) gekreuzt und die nach Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen auf Genitacin Resistenz (G418; 200 mg/l YPD) sowie fehlende Leucinprototrophie, Uracilprototrophie und Histidinprototrophie selektioniert. Zudem wurde in einer Expressionskontrolle CPY\* nachgewiesen und der Paarungstyp festgestellt.

#### **YOF81**

Dieser Stamm wurde aus dem Stamm YOF70 nach (Knop *et al.*, 1999) erzeugt. Dazu wurde zunächst mittels PCR von dem Plasmid pYM2 und den Oligonukleotiden 5'MNS1HAKno und 3'MNS1HAKno ein 1674 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Damit wurde der Stamm YOF70 transformiert und auf Histidinprototrophie selektioniert. Eine Expressionskontrolle zeigte ein Signal mit Anti-HA-Antikörpern in der erwarteten Höhe von 69 kDa im Vergleich zu W303-1C.

#### **YOF82**

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung erzeugt. Der Stamm YOF31 wurde mit dem Stamm W303-CM gekreuzt und die nach Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen auf vorhandene Uracilprototrophie und Histidinprototrophie sowie auf fehlende Leucinprototrophie selektioniert. Zudem wurde in einer Expressionskontrolle CPY\* nachgewiesen und der Paarungstyp festgestellt.

#### **YOF84**

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung erzeugt. Der Stamm YOF46 wurde mit dem Stamm YOF81 gekreuzt und die nach Sporulation und Tetradendisektion erhaltenen Sporen auf vorhandene Histidinprototrophie und Leucinprototrophie sowie auf fehlende Genitacin Resistenz selektioniert. Im Rahmen einer Expressionskontrolle konnten Mns1-HA<sub>3</sub>- und Htm1-Myc<sub>13</sub>-Signale, aber kein CPY\*-Signal detektiert werden.

## **YOF85**

Dieser Stamm wurde durch die gleiche Kreuzung erzeugt, wie YOF84. Im Rahmen der Expressionskontrolle konnte hier ein Mns1-HA<sub>3</sub>-, ein Htm1-Myc<sub>13</sub>- und ein CPY\*-Signal detektiert werden.

## **Konstruktion von Plasmiden**

### **pOF31**

Dieses Plasmid ist subkloniert aus pRS315-Yos9-FLAG (Bhamidipati *et al.*, 2005) und dem Vektor pRS314. Dazu wurde aus dem pRS315-Yos9-FLAG mit den Restriktionsendonukleasen *SmaI* und *SacI* ein ca. 2200 bp großes DNA-Fragment *YOS9-3FLAG* (mit *YOS9*-Promotor) ausgeschnitten und isoliert. Dieses Fragment wurde in den mit *SmaI* und *SacI* linearisierten Vektor pRS314 kloniert. Verifiziert wurde das Plasmid durch Kontrollverdau, Wachstumstest auf Tryptophan defizientem CM-Medium in Hefe und einer Expressionskontrolle in Hefe, in der ein Signal mit anti-FLAG-Antikörpern in der erwarteten Höhe von ca. 75 kDa gegenüber dem leeren pRS314 mit anti-FLAG Antikörpern detektiert werden konnte.

### **pOF37**

Dieses Plasmid entstand durch Klonierung der *HTM1-13Myc*-Sequenz aus YOF31 in den Vektor pRS314. Zunächst wurde mit den beiden Oligonukleotiden Htm1a2 (800 bp vor dem Start-Codon des *HTM1*) und Htm1b2 (Ende *ADH1* Termination der *13Myc::HIS3MX6*-Kassette) mittels PCR ein 3998 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Dieses wurde an den Enden durch die mit Hilfe der Oligonukleotide eingefügten Schnittstellen *SacI* und *ApaI* restriktionsverdaut und in den *SacI* und *ApaI* linearisierten Vektor pRS314 kloniert. Verifiziert wurde das Plasmid durch Kontrollverdau, Wachstumstest auf Tryptophan defizientem CM-Medium in Hefe und einer Expressionskontrolle in Hefe, in der das Htm1-Myc<sub>13</sub> Signals detektiert wurde.

### **pOF41**

Dieses Plasmid wurde analog zu pOF37 kloniert, mit dem Unterschied, dass der Vektor pRS424 verwendet wurde.

## **Proteinbiochemische Methoden**

### **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Diese Methode diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse und wurde analog zu (Lämmli, 1970) durchgeführt.

Es wurden pro Laufbahn 12 – 18 µl Proteinextrakt in Harnstoffprobenpuffer (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) aufgetragen und zunächst bei 25 mA (ca. 20 min), dann mit 40 mA/Gel (ca. 50 min) aufgetrennt. Dies erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris/HCl, 200 mM L-Glycin, 0,1% (w/v) SDS). Es wurden 7,5 %-ige, 8 %-ige und 10 %-ige Gele verwendet, je nach analysierte Protein und Aufgabenstellung.

<b>Lösungen</b>	<b>7,5 % Trenngel</b>	<b>8 % Trenngel</b>	<b>10 % Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
1,5 M Tris; 0,4 % SDS pH 8,8	3,0 ml	3,0ml	3,0 ml	
0,5 M Tris; 0,4 % SDS pH 6,8				1,25 ml
30 % Acrylamid	3,0 ml	3,2 ml	4,0 ml	0,65 ml
Wasser	5,97 ml	5,77 ml	4,97 ml	3,05 ml
10 % APS	60 µl	60 µl	60 µl	25 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	5 µl

### **Westernblot**

Die Proteine aus der SDS-Gelelektrophorese wurden mittels einer Semidry-Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Ausubel *et al.*, 1992). Mit Blottingpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,02 % SDS w/v; 20 % Methanol) als Elektrolyt wurde der Transfer 1,5 h mit 75 mA/Blot durchgeführt.

### **Immunodetektion von Proteinen**

Die mit den Proteinen behaftete Nitrozellulosemembran aus dem Westernblot (s.o.) wurde zunächst zur Abdeckung der noch freien Bindungsstellen über Nacht bei 8 °C in „Coating“-Lösung (5 % Milchpulver in TBS-T: 20 mM Tris/HCl; pH 7,6; 137 mM Natriumchlorid; 0,1

% Tween-20) geschwenkt. Nach zweimaligem Spülen wurde die Membran in TBS-T, das den entsprechenden Antikörper gegen das zu detektierende Protein in oben angegebener Verdünnung enthielt, bei RT 1,5 h unter Schwenken inkubiert. Darauf folgte ein vier-maliges 10-minütiges Waschen mit TBS-T. Dann wurde der sekundäre Antikörper (Peroxidase-markierter Ziege anti-Kaninchen- bzw. Ziege anti-Maus-Antikörper, s.o.) in TBS-T mit 1 % Milch zur Inkubation mit der Membran für 1,5 h bei RT eingesetzt. Anschließend erfolgte wieder vier-maliges Waschen mit TBS-T. Auf die Membran wurde dann 1 ml ECL-Lösung (500 µl Lösung 1 + 500 µl Lösung 2) verteilt, 1 min inkubiert, anschließend wurde ein lichtempfindlichen Film aufgelegt und entwickelt.

### **Cycloheximid Chase Analyse**

Für die qualitative Bestimmung des Abbaus von Proteinen über die Zeit („Abbaukinetik“) in lebenden Zellen wurde die immunologische Detektion von Proteinen nach Unterbrechung der Neusynthese durch Cycloheximid durchgeführt. Dazu wurde 10 OD Zellen, die bis zu einer  $OD_{600} = 0,8-1$  bei 30 °C inkubiert wurden, in 2,6 ml frischem CM-Selektionsmedium überführt und 150 µl Cycloheximid (10mg/ml) zugegeben. Unmittelbar darauf wurden 500 µl als erste Probe bei  $t = 0$  entnommen und in 500 µl eisgekühlte 30 mM Natriumazidlösung überführt. Alle weiteren Proben wurden zu den in den Experimenten angegebenen Zeiten entsprechend entnommen. Anschließend wurde zu den Proben 150 µl Lysispuffer (1,85 M NaOH, 7,5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol w/v) pipettiert, gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 50 %iger TCA wurde nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Das 10 min bei 14.000 rpm abzentrifugierte und mit Aceton gewaschene Präzipitat wurde in Harnstoffprobenpuffer (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) bei 95 °C 5 min (bei CPY\*-Detektion) oder bei 37 °C 20 min (alle anderen Versuche) erhitzt. Mit den Proben wurde dann eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s.o.), Westernblot (s.o.) und eine Immunodetektion von Proteinen (s.o.) durchgeführt.

### **Pulse-Chase Analyse**

Für die quantitative Bestimmung des Abbaus von Proteinen über die Zeit („Abbaukinetik“) in lebenden Zellen wurde die Detektion von radioaktiv markierten Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden Zellen in 1 %-Glucose-haltigem Uracil defizientem CM-Medium (mit CPY\*- oder CPY\*-Derivate-kodierende Plasmide mit pRS316 Hintergrund) oder Tryptophan

defizientem CM-Medium (für Htm1- oder Mns1-kodierenden Plasmiden mit pRS314/pRS424 Hintergrund) angeimpft. Diese Kulturen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 0,8 - 1$  bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 10 OD Zellen in 1,5 ml „labeling“ Medium (CM -Medium ohne Methionin, Cystein, Ammoniumsulfat und mit 0,1% Glucose) 50 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  weiter inkubiert. Durch Zugabe von  $200 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S}$ -Methionin wurden die Zellen für 20 min markiert („pulse“). Der Stop des  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Einbaus in neu synthetisierte Proteine wurde durch die Zugabe von 1,5 ml „chase“-Medium (6 mg/ml Methionin und 2 mg/ml BSA in „labeling“ Medium) erreicht. Hiernach wurde sofort eine 450  $\mu\text{l}$  Probe dieses Gemisches entnommen, in 50  $\mu\text{l}$  110% TCA pipettiert und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  mindestens 1 h eingefroren. Diese erste Probe ist die  $t = 0$  Probe gewesen und alle weiteren so behandelten Proben wurden zu den in den Experimenten angegebenen Zeitpunkten gezogen. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  BB1-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 6 M Harnstoff; 1 % SDS w/v; 1 mM EDTA) mit ca. 60  $\mu\text{l}$  Glasperlen lysiert, indem sie fünfmal abwechselnd 1 min auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und 1 min mit einer Rüttelplattform gevortext wurden. Anschließend wurde 1 ml IP-Puffer zugegeben (50 mM Tris/HCl pH7,5; 1,25 % v/v Triton X-100; 6 mM EDTA; 190 mM Natriumchlorid, bei IP von CTG\* inklusive 5  $\mu\text{l}$  Inhibitor-Complete-Mix, Boehringer) und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min bei 14000 xg). Die Immunpräzipitation erfolgte mit 5  $\mu\text{l}$  CPY-spezifischen polyklonalen Antikörpern über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  am Überkopfschüttler. Mit 80  $\mu\text{l}$  7 %iger Protein A Sepharose Suspension, die zuvor 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  in IP-Puffer quellen konnte, wurde eine weitere Stunde im Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Danach wurde die Sepharose dreimal mit IP-Puffer gewaschen und mit 60  $\mu\text{l}$  Harnstoffprobenpuffer (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) bei  $95^{\circ}\text{C}$  5 min erhitzt. Mit diesen Proben wurde dann eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s.o.) durchgeführt und das Gel bei  $70^{\circ}\text{C}$  auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Zur Detektion wurde eine Autoradiographie durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Detektionsscreen (Amersham) und einem PhosphorImager (Molecular Probes, GE).

### **Co-Immunopräzipitation**

Für die Präzipitation mit zwei verschiedenen Antikörpern pro Stamm wurden aus einer Kultur bei einer  $OD_{600}$  von 0,8 bis 1,2 400 OD Zellen geerntet. Das Zellsediment wurde in 45 ml 20 mM Natriumazidlösung resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert.

Der Zellaufschluss erfolgte mit zweifachem Feuchtvolumen Glasperlen in drei-fachem Feuchtvolumen Lysispuffer (10 % Glycerin; 50 mM Tris/HCl; 0,5 mM EDTA; 200 mM Natriumacetat; Complete-Mix-Proteaseinhibitor der Fa. Roche; 2,5 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Antipain; 6µg/ml Chymostatin; 1 mM PMSF; pH 7,5) und 12-maligem 1 min Vortexen und 1 min Inkubation auf Eis. Alle weiteren Schritte, soweit nicht anders vermerkt, erfolgten ab hier bei 4 °C. Der Überstand wurde mehrfach bei 1500 xg 10 min zentrifugiert bis sich kein sichtbares Pellet mehr bildete. Dieses Lysat wurde anschließend bei 100.000 xg 1,5 h zentrifugiert. Das entstandene Membranen-Pellet wurde in 4 ml IP-Puffer (1 % Digitonin; 165 mM Natriumchlorid; 5,5 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl; Complete-Mix-Proteaseinhibitor der Fa. Roche; 2,5 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Antipain; 6µg/ml Chymostatin; 1 mM PMSF; 15,4 µg/ml DTT; pH 8) durch auf- und abpipettieren resuspendiert, bis eine einheitliche Suspension entstand und anschließend in einer einstündiger Über-Kopf-Rotation solubilisiert.

Danach wurde das Solubilisat 35 min bei 75.000 rpm (250.000 xg) zentrifugiert und der Überstand auf zwei gleich große Portionen verteilt, dem die jeweiligen Antikörper (s.o.) zugegeben wurden. Diese Proben wurden 14-16 h Über-Kopf rotiert, anschließend wurde pro Antikörper-Probe 50 µl equilibrierte ProteinA/ProteinG-Sepharose-Suspension zugegeben. Weitere 4 h Über-Kopf-Rotation folgten darauf hin.

Die Sepharose wurden dann bei 2000 rpm 2 min abzentrifugiert und 4 mal mit 1 ml Wasch-Puffer (0,5 % Digitonin; 165 mM Natriumchlorid; 5,5 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl; Complete-Mix-Proteaseinhibitor der Fa. Roche; 2,5 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Antipain; 6µg/ml Chymostatin; 1 mM PMSF; 15,4 µg/ml DTT; pH 8) gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose mit 60 µl Harnstoffprobenpuffer (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) 30 min bei 37 °C geschüttelt und ein SDS-PAGE (s.o.), ein Westernblot (s.o.) und eine Immunodetektion (s.o.) durchgeführt.

Peptid-Elution-Variante: Die Sepharose wurden in einer Mini-Säule gesammelt und drei Mal mit 20 µl Wasch-Puffer inklusive der entsprechenden Peptide (s.o.) eluiert. Dabei wurde jeweils eine Inkubation von 15 min der Sepharose mit der Peptidlösung eingehalten.

### **Silber-Färbung von Proteinen in SDS-Gelen (Blum, 1987)**

Ein SDS-Polyacrylamid-Gel wurde 10 min in Fixierlösung (40 % Methanol, 13,5 % gesättigte Formaldehydlösung) geschwenkt und anschließend zweimal 5 min mit Wasser gewaschen.

Dann wurde das Gel 1 min in 0,02 %iger Natriumthiosulfatlösung geschwenkt und wieder zweimal 20 sek mit Wasser gewaschen. Danach wurde es in 0,1 %iger Silbernitratlösung geschwenkt und anschließend mind. drei mal 20 sek mit Wasser gewaschen und die Reste der Farbe-Lösung mit Entwicklerlösung (3 % Natriumcarbonat; 0,05 % Formaldehydlösung; 0,000016 % Natriumthiosulfat) entfernt. In dieser Entwicklerlösung blieb das Gel solange, bis einzelne Protein-Banden sichtbar wurden und bis die gewünschte Intensität erreicht war. Der Prozess der Färbung wurde in einem Bad von 50 mM EDTA oder 2,3 M Zitronensäure gestoppt. Anschließend wurde das Gel eingescannt und bei 70°C auf einem Vakuumtrockner getrocknet.



## Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit geht Fragen zur ER-abhängigen Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine (ERQC) und der ER abhängigen Proteindegradation (ERAD) durch das Ubiquitin-Proteasom-System nach. Der Schwerpunkt liegt insbesondere auf der Erkennung fehlgefalteter *N*-glykosylierter sekretorischer Proteine, der Bedeutung der Glykane dieser ERAD-Substrate und der Analyse von Komponenten, die solche Substrate für den Abbau markieren. CPY\* dient hierbei als Modellsubstrat. Es ist eine punktmutierte Form der vakuolären Carboxypeptidase *yscY* der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Mutation Glycin anstelle von Arginin an Position 255 führt dazu, dass CPY\* im ER nicht seine korrekte native Konformation erreicht, vom ERQC erkannt wird und wieder aus dem ER ins Zytosol transloziert wird, wo es schließlich durch das Proteasom degradiert wird (Hiller *et al.*, 1996; Kostova and Wolf, 2003).

Die Arbeit besteht aus vier Teilen. Zunächst wurde untersucht, wie fehlgefaltete unglykosylierte Proteine im sekretorischen Weg degradiert werden. Im Rahmen einer Kooperation sollte ferner der Einfluss des ER-Membranproteins Usa1 auf den Abbau fehlgefalteter glykosylierter Membranproteine untersucht werden. Im Weiteren wurden Bindungsstudien mit den beiden potentiellen Lektine Yos9 und Htm1 durchgeführt. Der letzte Teil behandelt Degradationsanalysen, die über einen genetischen Zusammenhang Hinweise auf die Funktion von Htm1 bezüglich glykosylierte Substrate im ERAD liefert. Die Studien wurden an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, die einen ausgezeichneten Modellorganismus zur Aufklärung eukaryontischer Zellfunktionen darstellt.

### **Teil 1: Degradationsweg unglykosylierter ERAD Substrate**

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) der eukaryontischen Zelle enthält ein Protein-Qualitätskontrollsystem (ERQC), das für die proteolytische Entfernung von fehlgefalteten sekretorischen Proteinen sorgt. In der Hefe ist eines dieser sekretorischen Proteine die vierfach *N*-glykosylierte vakuoläre Carboxypeptidase *yscY* (CPY), deren punktmutierte Variante (CPY\*) im ER keine native Struktur erreicht und im Rahmen der ER-abhängigen Proteindegradation (ERAD) mit einer Halbwertszeit von 20 min proteolysiert wird (Finger *et al.*, 1993). Da die Erkennung der Fehlfaltung und die Degradation dieser Form von der Glykanstruktur abhängig ist (Kostova and Wolf, 2005), war es von Interesse zu erarbeiten,

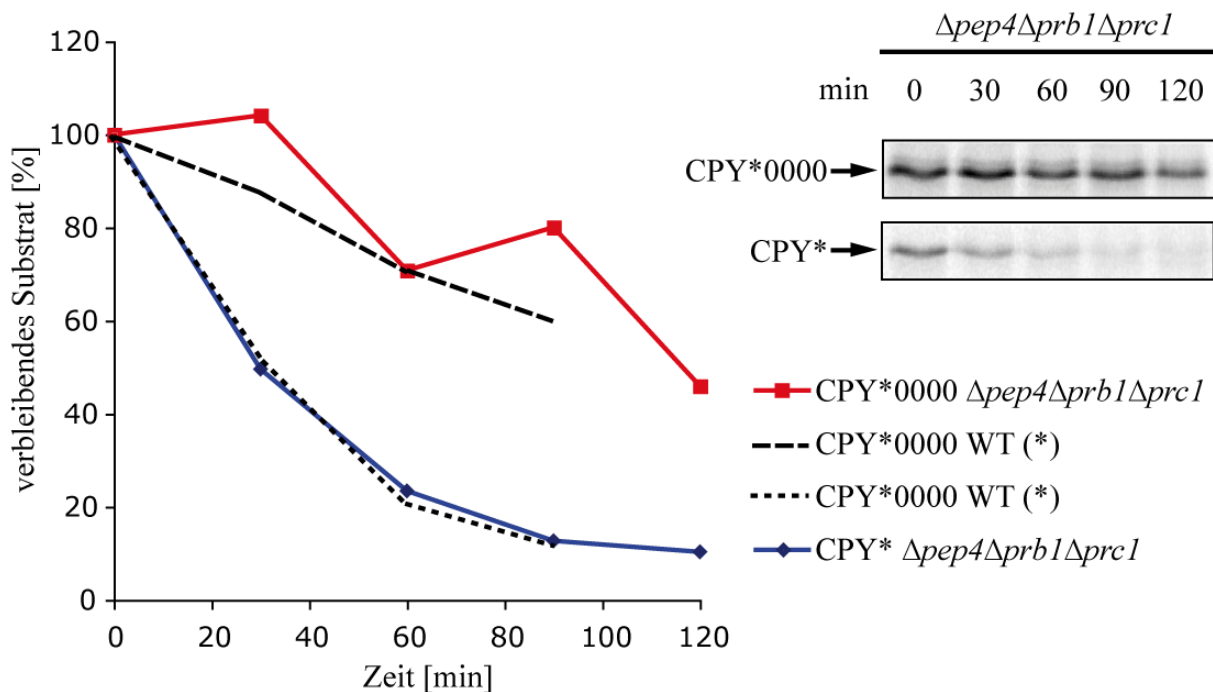
wie unglykosylierte fehlgefaltete Proteine erkannt und eliminiert werden können. In unserem Labor wurde ein CPY\*-Derivat erzeugt, CPY\*0000 (*prc1-1,0000*), das in allen N-Glykosylierungsstellen eine Mutation (T15A, N87I, N168Q, N368Q) aufweist, so dass diese nicht mehr mit Glykanen versehen werden. Mit dieser vollständig unglykosylierten CPY\*0000 war bereits gezeigt worden, dass die Glykane eine prominente Rolle in der ER-abhängigen Degradation sekretorischer Glykoproteine spielen (Knop *et al.*, 1996b). In Zellen Wild Typ für die ER Degradation wird die unglykosylierte Variante CPY\*0000 stark verzögert degradiert (Kostova and Wolf, 2005). Man beobachtet allerdings noch eine partielle Degradation von rund 40 % nach 90 min. Über die Glykanstruktur kann nach dem „Time-Trimming“-Modell keine Erkennung der Fehlfaltung mehr stattfinden. Es war die Frage, ob solche unglykosylierten Substrate noch von ERQC/ERAD erfasst werden oder der beobachtete Abbau einen anderen Degradationsweg benötigt. Denkbar wäre ein vakuolärer (Hong *et al.*, 1996) oder ein Der3 unabhängiger Weg (HIP-Weg) (Haynes *et al.*, 2002).

### **CPY\*0000 wird nicht vakuolär abgebaut**

Es war auf Grund früherer Studien zweier ERQC-Substrate eine Alternative zum ERAD vorgeschlagen worden. Hier handelt es sich einmal um ein chimäres Substrat aus Invertase mit einer mutierten Form des Lambda Repressor Proteins, welches den normalen Reifungsweg vom ER zum Golgi durchläuft, dort durch Vps10 zur Vakuole dirigiert und hier vom proteolytischen System der Vakuole degradiert wird (Hong *et al.*, 1996). Ein weiteres Substrat ist die mutierte Form des  $\alpha$ -Faktor Rezeptors Ste2\*, welches in der Vakuole PEP4-abhängig degradiert wird (Jenness *et al.*, 1997). Pep4 und Prb1 sind die wichtigsten Proteasen in der Vakuole und vermitteln sowohl die Reifung und damit verbundene Aktivierung von vakuolären Proteinase (Rupp and Wolf, 1995) als auch den Abbau von in die Vakuole gelangenden Proteinen. Es sollte geprüft werden, ob der partielle Abbau von CPY\*0000 eventuell von der Proteinase-Aktivität der Vakuole abhängt.

In einem Stamm mit Deletionen der vakuolären Proteinase A, Proteinase B und CPY ( $\Delta pep4 \Delta prb1 \Delta prc1$ ), wurde Plasmid-kodierte CPY\*0000 und CPY\* exprimiert und eine Pulse-Chase Analyse durchgeführt (Abb. 5).

Wie zu sehen ist, kann nach 120 min nur noch 10 % der Ausgangsmenge des ERAD-Substrats CPY\* wird im vakuolären Mutantenstamm  $\Delta pep4 \Delta prb1 \Delta prc1$  detektiert werden, d. h. 90 % der CPY\* wird in dieser Zeit abgebaut. Dies wurde erwartet, da die Degradation von CPY\* nicht von der Vakuole abhängt. Von dem Substrat CPY\*0000 wird nach 120 min noch 50 % der Ausgangsmenge detektiert, d. h. 50 % der unglykosylierten CPY\*0000 wird nach wie vor in dem vakuolären Mutantenstamm  $\Delta pep4 \Delta prb1 \Delta prc1$  abgebaut. Diese Abbaurate entspricht in etwa der von Kostova und Wolf, 2005 gefundenen Abbaurate von 40 % nach 90 min im Wildtypstamm. Also wird der Abbau von CPY\*0000 durch die fehlenden Protease-Aktivität in der Vakuole nicht gestoppt.



**Abb. 5: CPY\*0000 wird in vakuolären Mutanten weiter partiell abgebaut.** Das Diagramm und Autoradiogramm zeigt die Puls-Chase Analyse des W303  $\Delta pep4 \Delta prb1 \Delta prc1$  Stamms, der Plasmid-kodierte CPY\* oder CPY\*0000 exprimiert. Die Proben wurden in Abständen von 30 min von 0 bis 2 Stunden entnommen und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. (\*) WT: zum Vergleich übernommen aus Kostova and Wolf, 2005.

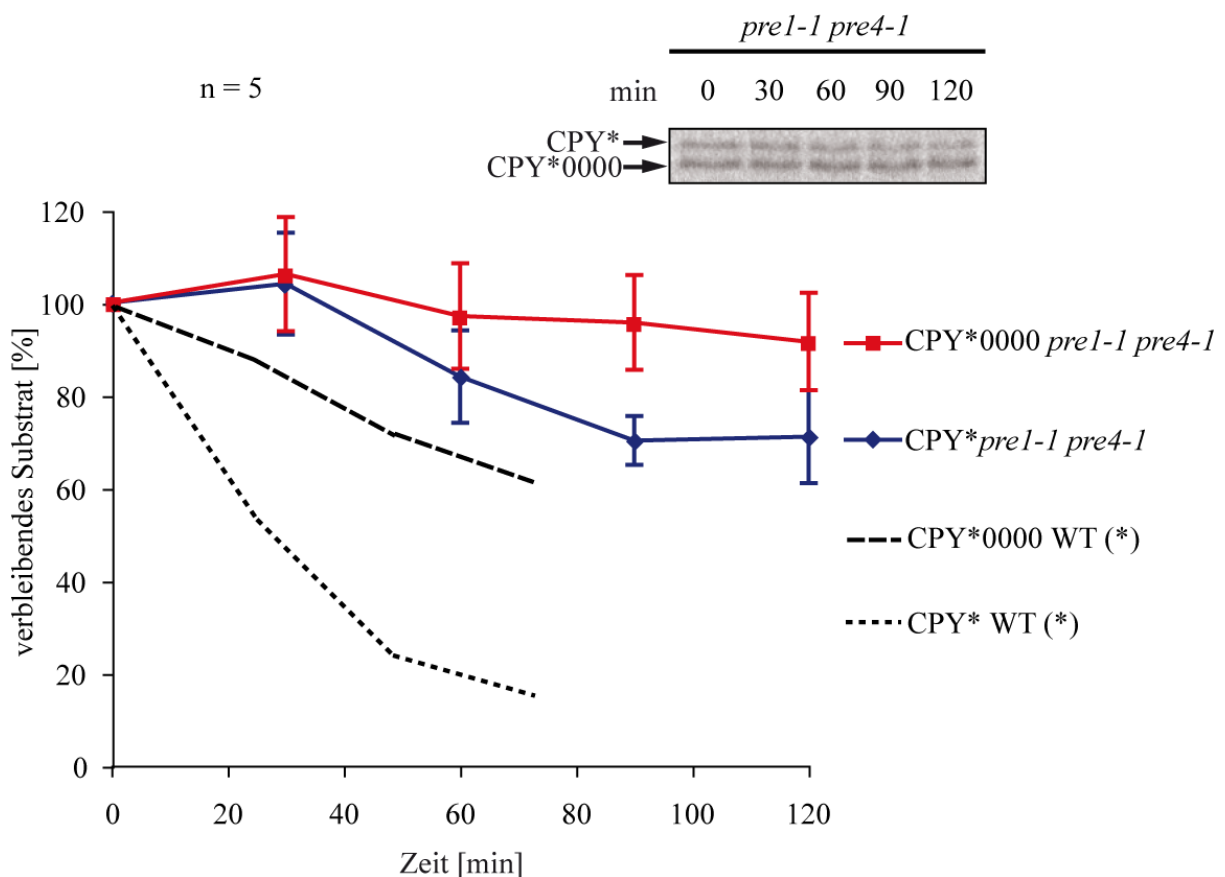
### CPY\*0000 wird über das Proteasom degradiert

CPY\*, CPY\*-Derivate und andere bisher untersuchte Substrate der ERQC werden über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert (Hiller *et al.*, 1996; Kostova and Wolf, 2002;

Plempner *et al.*, 1997). Wenn CPY\*0000 auch über dieses System proteolysiert wird, dann sollte in einer Proteasommutante ein geringerer Abbau von CPY\*0000 beobachtet werden als im Wildtypstamm (WT).

Deshalb wurde Plasmid-kodierte CPY\*0000 in dem Stamm WCG4 Ya *pre1-1 pre4-1 prc1-1* exprimiert und der Abbau in einer Pulse-Chase Analyse quantifiziert (Abb. 6).

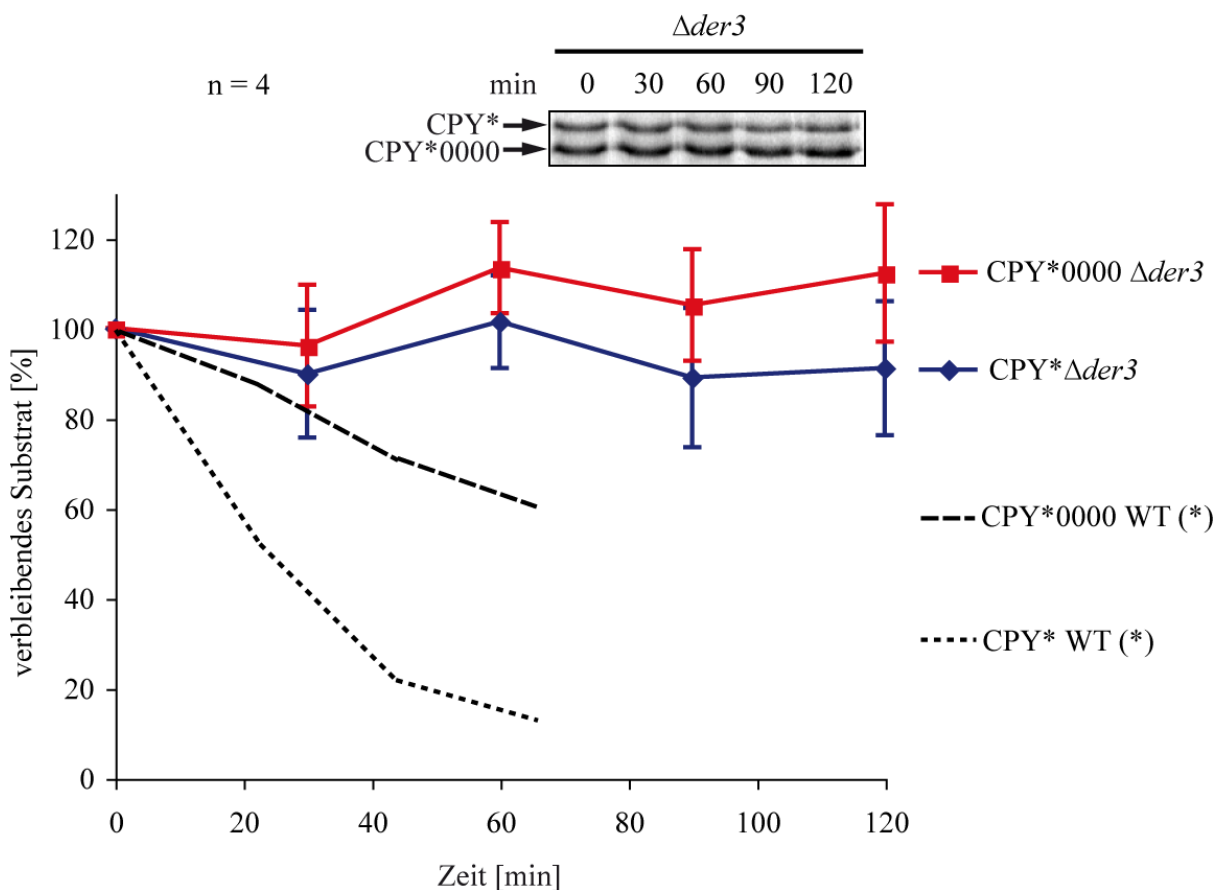
Es ist zu erkennen, dass der Abbau von den beiden Substraten CPY\* und CPY\*0000 in dieser Proteasommutante signifikant verlangsamt ist. Die Proteasomenaktivität des Mutantenstamms *pre1-1 pre4-1* ist auf 25 % der WT-Peptidaseaktivität reduziert (Ferdous *et al.*, 2001; Heinemeyer *et al.*, 1991; Hilt *et al.*, 1993). Es muss also gefolgert werden, dass der Abbau von CPY\*0000 proteasomal abhängig ist.



**Abb. 6: In proteasomalen *pre1-1 pre4-1* Mutante ist der Abbau von CPY\*0000 stark reduziert.** Diagramm und Autoradiogramm der Pulse-Chase Analyse eines WCG4Ya *pre1-1 pre4-1 prc1-1* - Stamms, der CPY\*0000 Plasmid-kodiert und CPY\* endogen kodiert exprimiert. Die Proben wurden in Abständen von 30 min von 0 bis 2 Stunden entnommen und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. Das Autoradiogramm zeigt exemplarisch einen von fünf unabhängigen Versuchen. (\*) WT: zum Vergleich übernommen aus Kostova and Wolf, 2005.

## CPY\*0000 ist ein ERAD-Substrat

Wenn CPY\*0000 proteasomal degradiert wird, dann bleibt die Frage offen, über welchen Weg dies geschieht. Ein Indikator hierfür ist die für den Abbau notwendige E3 Ligase. Würde CPY\*0000 wie CPY\* über die E3-Ubiquitinligase Der3 ubiquitiniert werden, wäre sie somit ein Substrat des ERAD-L-Degradationsweges. Nicht auszuschließen wäre auch die Ubiquitinligase Doa10, die aber bisher nur für ERAD-C Substrate als notwendiges E3 gefunden wurde (Swanson *et al.*, 2001; Vashist and Ng, 2004). Ein weiterer Weg ist der sogenannte „Hrd1 independent-proteolysis“ (HIP) Weg, bei dem Substrate wie CPY\* bei Überexpression oder bei Ausfall von Der3 von der E3 Ubiquitin Ligase Rsp5 ubiquitiniert werden. Dieser Weg wird vermutlich als Reaktion auf zu viele ungefaltete Substrate im ER eingeschlagen, reguliert durch den „unfolded protein response“ (UPR) (Haynes *et al.*, 2002).



**Abb. 7: CPY\*0000 wird in  $\Delta der3$  Mutanten nicht abgebaut.** Diagramm und Autoradiogramm der Pulse-Chase Analyse von einem W303  $\Delta der3$  *prc1-1* -Stamm, der CPY\*0000 Plasmid-kodiert und CPY\* endogen kodiert exprimiert. Die Proben wurden in Abständen von 30 min von 0 bis 2 Stunden entnommen und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. Das Autoradiogramm zeigt exemplarisch einen der vier unabhängigen Versuche. (\*) WT: zum Vergleich übernommen aus Kostova and Wolf, 2005.

Um zu verstehen, welche E3 Ligase für den Abbau von CPY\*0000 notwendig ist, wurden weitere Pulse-Chase Analysen mit einem  $\Delta der3$ -Stamm durchgeführt, der endogen *prc1-1* kodiert und Plasmid kodierte CPY\*0000 exprimiert.

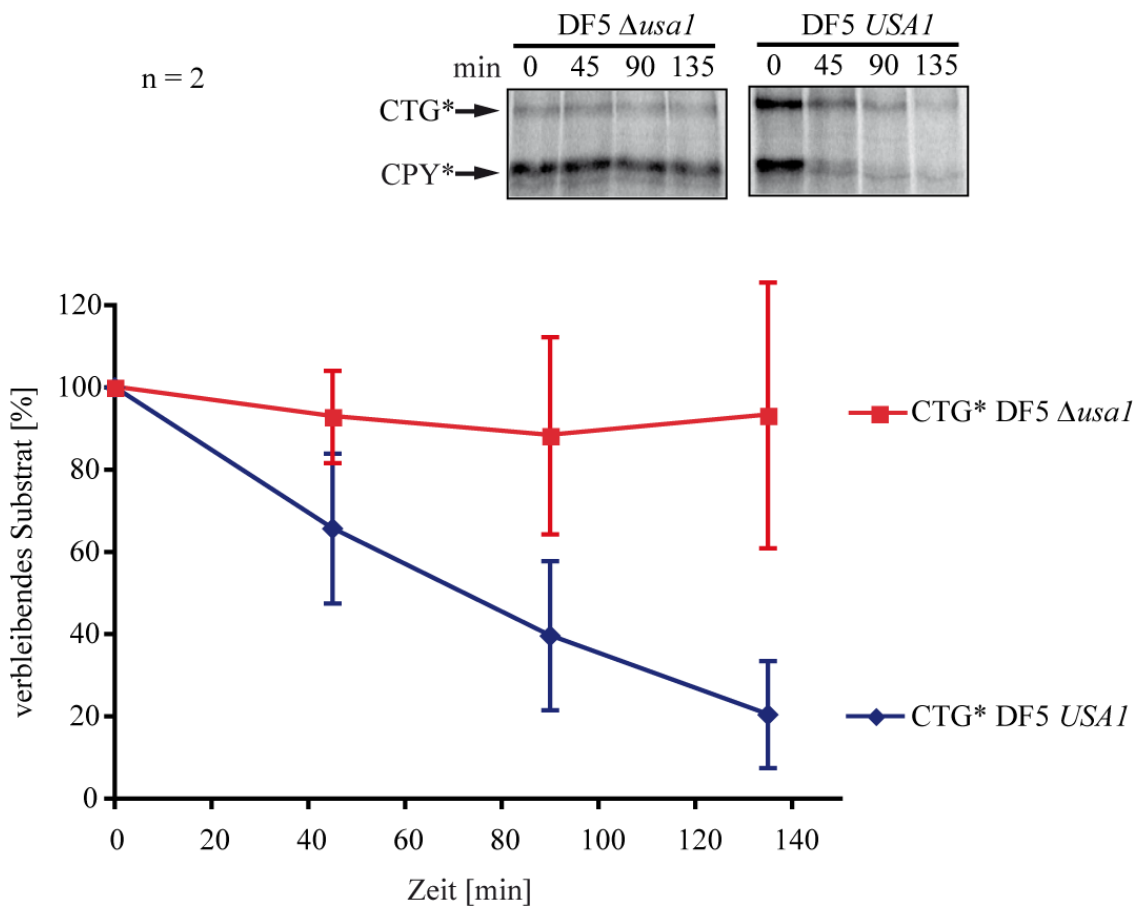
Wie in Abb. 7 zu sehen ist, wird im  $\Delta der3$  Stamm CPY\*0000 nicht abgebaut. Dass es sich hier um die fehlende Funktion der E3 Ligase Der3 handelt, zeigt der gleichzeitig blockierte Abbau des kanonischen Der3 Substrates CPY\*. Somit ist der Abbau von CPY\*0000 von Der3 abhängig und damit ein Substrat des ERAD.

## **Teil 2: Usa1-Funktion ist abhängig vom genetischen Hintergrund des verwendeten Stamms**

Usa1 ist ein Transmembran-Protein des endoplasmatischen Retikulums mit einer Ubiquitin-ähnlichen (UBL) Domäne. Eine Studie zeigte Usa1 zusammen mit Der1 als notwendig für den Abbau fehlgefalteter, löslicher ER-luminaler Proteine (ERAD-L-Substrate) (Carvalho *et al.*, 2006). Fehlgefaltete Membranproteine benötigen nach dem Modell von Carvalho *et al.* weder Der1 noch Usa1. Dies wurde u.a. am Beispiel des Modellsubstrates Sec61-2 gezeigt, das 10 Transmembrandomänen enthält und über den ERAD-M Weg abgebaut wird. Im Gegensatz zu diesem Modell steht die Beobachtung aus einem genomweiten Wachstumstest. Ein Sec61-2-Derivat mit einer zytosolischen Leu2-Domäne (Sec61-2L) wurde in einem  $\Delta usa1$  BY4743-Stamm exprimiert. Bei diesem Stamm konnte ein Wachstum auf Leucin defizientem Medium festgestellt werden (Kohlmann, 2007). Das deutet darauf hin, dass Sec61-2L Usa1-abhängig abgebaut wird und auf Basis der obigen Definition kein ERAD-M-Substrat mehr sein kann. Ein anderes membranständiges Substrat CTG\* wird unabhängig von Der1 (Taxis *et al.*, 2003) und auch unabhängig von Usa1 abgebaut (Hisashi Hoshida, mündliche Mitteilung). Nach der Klassifizierung von Carvalho *et al.* müsste CTG\* dann ein ERAD-M-Substrat sein. CTG\* besitzt eine lumenale CPY\*-Domäne, die ursächlich für seine ER abhängige Degradation ist. Das aber widerspricht der Modellvorstellung von Carvalho *et al.*, 2006, dass ERAD-M-Substrate eine Fehlfaltung in der Membrandomäne aufweisen.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf Grund der unterschiedlichen Stammhintergründe zu erklären sein, auf die die Beobachtungen der jeweiligen Arbeitsgruppen beruhen. So beruhen die Ergebnisse von Carvalho *et al.*, 2006 auf Arbeiten mit dem Hefestamm BY4730. Die Ergebnisse von Taxis *et al.* und Hisashi Hoshida wurden im W303-Stammhintergrund erhalten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Abbauverhalten von CTG\* in einem weiteren Stammhintergrund DF5 (T. Sommer, MDC Berlin) ermittelt.

Es wurden der DF5-Stamm Wildtyp für *USA1* und der DF5-Stamm  $\Delta usa1$  mit einer *USA1* Deletion mit dem Plasmid, welches für CTG\* kodiert, transformiert. Mit den Transformanden wurden zwei unabhängige Pulse-Chase-Analysen durchgeführt (Abb. 8).



**Abb. 8: Im DF5-Stamm werden glykosylierte ERAD-L Membranproteine Usa1 abhängig abgebaut.** Das Diagramm zeigt eine Pulse-Chase Analyse in einem DF5 *USA1 prc1-1* und einem DF5  $\Delta usa1 prc1-1$  Stamm, die CTG\* Plasmid kodiert und CPY\* endogen exprimieren. Es wurden 4 Proben bei 0 min, 45 min, 90 min und 135 min entnommen und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. Das Autoradiogramm zeigt exemplarisch einen der zwei unabhängigen Versuche.

In beiden Versuchen zeigte sich eine deutliche verlangsamte Degradation von CTG\* in den  $\Delta usa1$ -Zellen im Vergleich zu den *USA1*-Wildtypzellen. Die Notwendigkeit der Funktion von Usa1 unterscheidet sich jedoch je nach verwendetem Stammhintergrund, da im W303-Stamm keine veränderte Degradation von CTG\* in einer *USA1* Deletion gefunden wurde (Hisashi Hoshida, mündliche Mitteilung; Taxis *et al.*, 2003).



### **Teil 3: Interaktionsstudien mit den ER Lektinen Yos9 und Htm1**

Die beiden Proteine Yos9 und Htm1 wurden anhand ihrer Sequenz und mittels genetischer Experimente als potentielle Lektine im ER identifiziert (Buschhorn *et al.*, 2004; Friedmann *et al.*, 2002; Jakob *et al.*, 2001; Nakatsukasa *et al.*, 2001). Sie könnten eventuell die durch die Enzyme Glucosidase I und II (Gls1, Gls2), sowie durch die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase (Mns1) von GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> zu GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> prozessierten Glykane an ungefalteten sekretorischen Proteinen erkennen, binden und dem retrograden Transport zum Ubiquitin-Proteasom-System zuführen. Damit könnte das „Time-Trimming“-Modell der ERQC weiter bestätigt werden (siehe Einleitung), das die Erkennung und Weiterleitung fehlgefalteter sekretorischer Proteine zur ER abhängigen Degradation durch die Verweildauer der sekretorischen Proteine im ER erklärt (Jakob *et al.*, 1998).

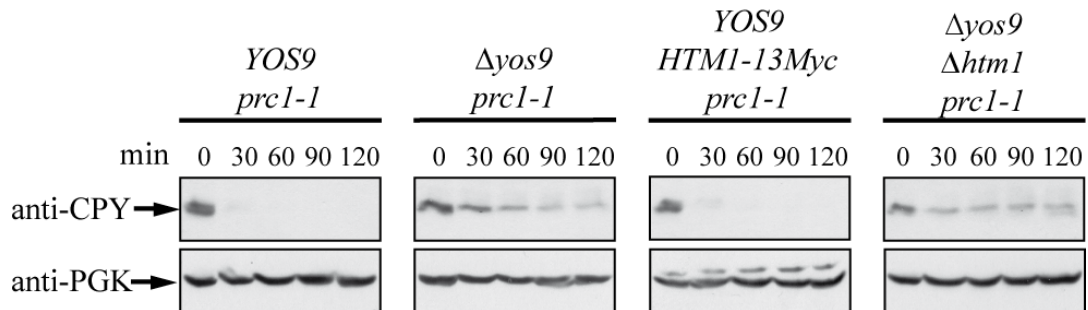
Um einen Einblick in die Funktion von Yos9 und Htm1 zu gewinnen und mögliche Bindungspartner zu identifizieren, wurden beide Proteine unter nativen Bedingungen isoliert. Im Laufe der Arbeit erschienen zu Yos9 mehrere Publikationen, die einen direkten Vergleich zu den hier beschriebenen Experimenten ermöglichen. Zudem wurde eine mögliche Interaktion zwischen Htm1 und Yos9 sowie Htm1 und Mns1 untersucht.

#### **Htm1 ist kein fester Bestandteil des „Gatekeeper“-Komplex**

Es wurde ein großer Komplex des ERAD gefunden, der sich um die transmembranständige E3-Ubiquitinligase Der3 herum gruppiert. Er besteht aus den cytosolischen Proteinen Cdc48 und Ubx2, aus den luminalen ER-Proteinen Kar2 und Yos9 sowie aus den ER-Membranproteinen Usa1, Der1, Der3 und Hrd3 (Bhamidipati *et al.*, 2005; Buschhorn *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2005; Szathmary *et al.*, 2005). Zudem wurde innerhalb dieses großen Komplexes noch ein kleinerer, auf der luminalen Seite des ER befindlicher „Überwachungskomplex“ identifiziert, der aus Yos9, Hrd3 und dem ER-Chaperon Kar2 besteht und der möglicherweise als „Gatekeeper“ den Glykosylierungsstatus eines Substrates kontrolliert.

Zunächst sollten weitere mögliche Bindungspartner von Yos9 und Htm1 gefunden werden. Dazu wurde zunächst Htm1 mit einer Myc-Markierung versehen in einem *YOS9*-Deletionsstamm und die Plasmide [*YOS9-3FLAG*] sowie [*prc1-1*], das für CPY\* kodiert, eingeschleust. Beide Proteinmarkierungen komplementieren die *HTM1*- bzw *YOS9*-Deletion

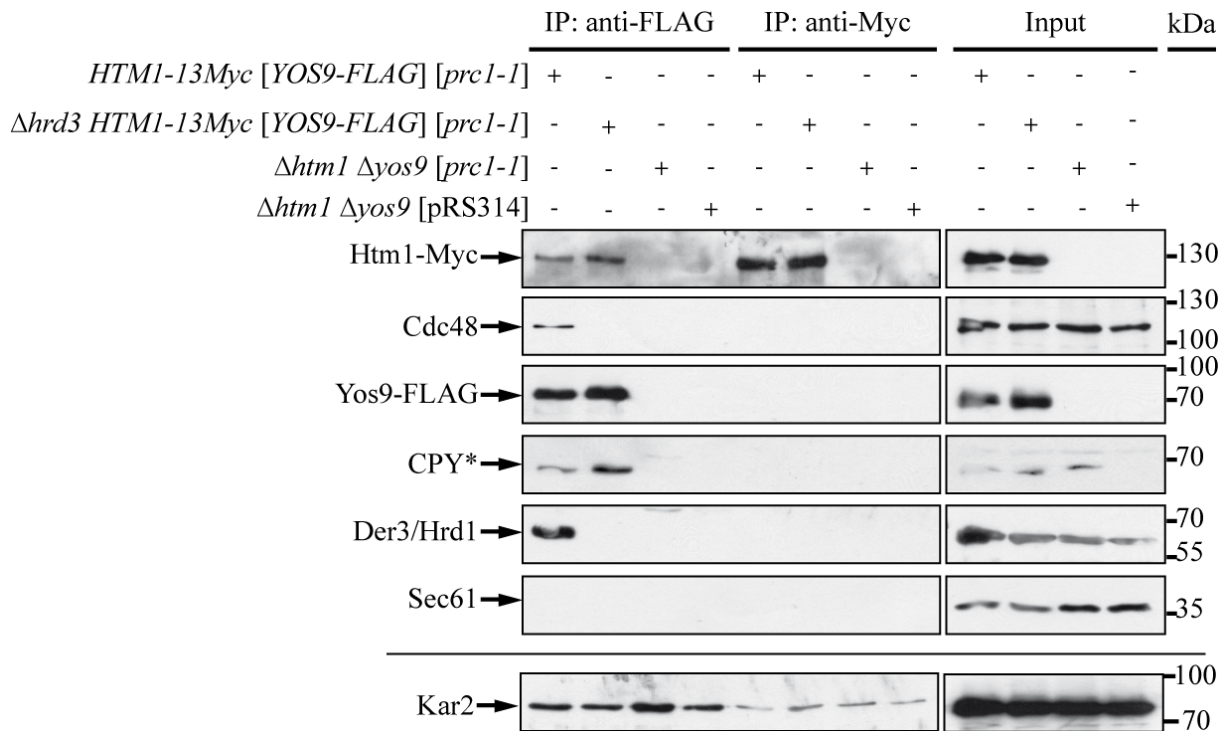
(Abb. 9, Abb. 13) (Bhamidipati *et al.*, 2005) und haben damit keinen Einfluss auf die Funktionalität der beiden Proteine.



**Abb. 9: Htm1-Myc13 komplementiert die HTM1-Deletion.** Gezeigt wird die Abbaukinetik von CPY\* in Cycloheximid-Chase Analysen in den Stämmen, die CPY\* Plasmid kodiert exprimieren: W303ΔC [*prc1-1*], *HTM1-13Myc* [*prc1-1*], *Δyos9* [*prc1-1*], und *Δyos9 Δhtml* [*prc1-1*]. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern, als Ladekontrolle wurde PGK detektiert.

Dann wurden Co-Immunopräzipitationen mit anschließender Peptidelution (Co-IP) mit den Stämmen der *HTM1-13Myc* [*YOS9-3FLAG*] [*prc1-1*], *HTM1-13Myc Δhrd3* [*YOS9-3FLAG*] [*prc1-1*], *Δhtml Δyos9 Δprc1* [*prc1-1*] und *Δhtml Δyos9 Δprc1* [pRS314] durchgeführt (Abb. 10).

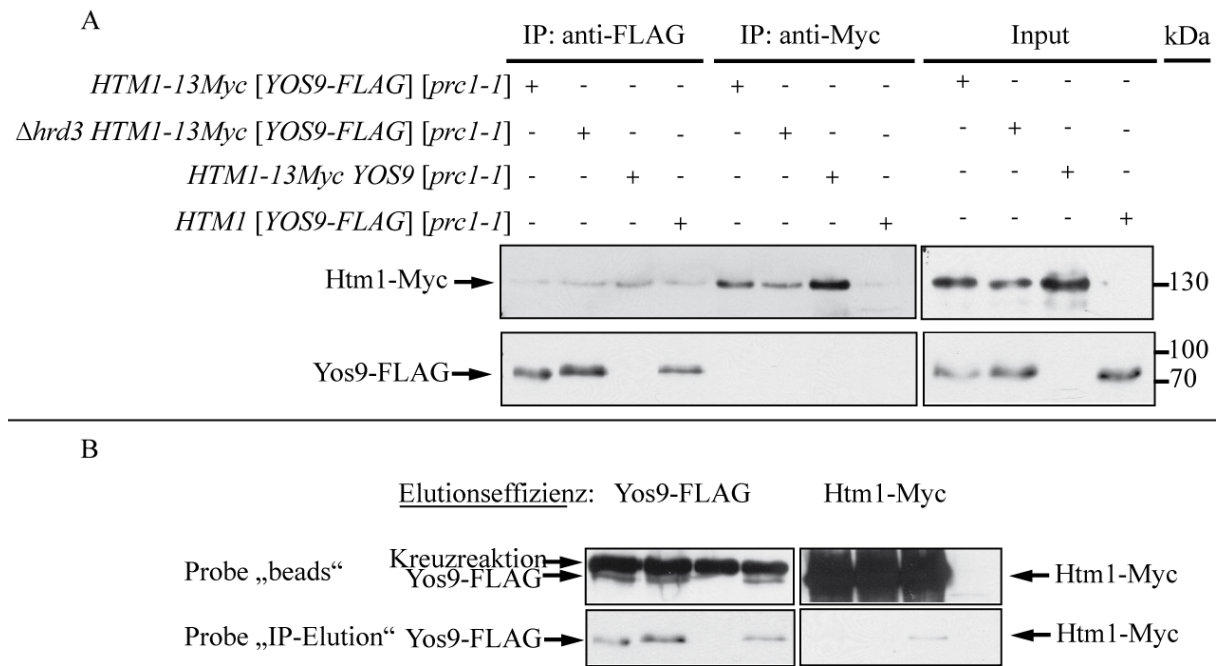
Yos9-FLAG<sub>3</sub> bindet Der3, Cdc48, CPY\* und Htm1-Myc<sub>13</sub>. Kar2 bindet in diesem Versuch unspezifisch. In dem *Δhrd3* Deletionsstamm geht die Bindung von Yos9-FLAG<sub>3</sub> zu Der3 und Cdc48 verloren, aber weiterhin bindet es CPY\* und Htm1-Myc<sub>13</sub>. CPY\* bindet sogar mehr, da CPY\* im *Δhrd3* Deletionsstamm stabilisiert wird (Plemper *et al.*, 1999a). In der Htm1-Myc<sub>13</sub>-Präzipitation allerdings findet sich keines dieser Proteine, auch nicht Yos9-FLAG<sub>3</sub>. Die Yos9-FLAG<sub>3</sub>-Bindung mit Htm1-Myc<sub>13</sub> in der Anti-FLAG-IP überraschte, denn in den Publikationen zum Der3-Komplex wurde nach einer solchen Bindung von Yos9 mit Htm1 gesucht und keine gefunden (Denic *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Szathmary *et al.*, 2005).



**Abb. 10: Yos9 interagiert mit Htm1, Cdc48, CPY\*, Der3, aber im  $\Delta$ *hrd3*-Stammhintergrund nur noch mit CPY\* und Htm1.** Die Membranproteine wurden mit Digitonin solubilisiert. Die IP erfolgte mit FLAG-Antikörpern oder mit Myc-Antikörpern und ProteinA/ProteinG-Sepharose. Die gebundenen Proteine wurden nach der Präzipitation mit FLAG- bzw. Myc-Peptiden eluiert. Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

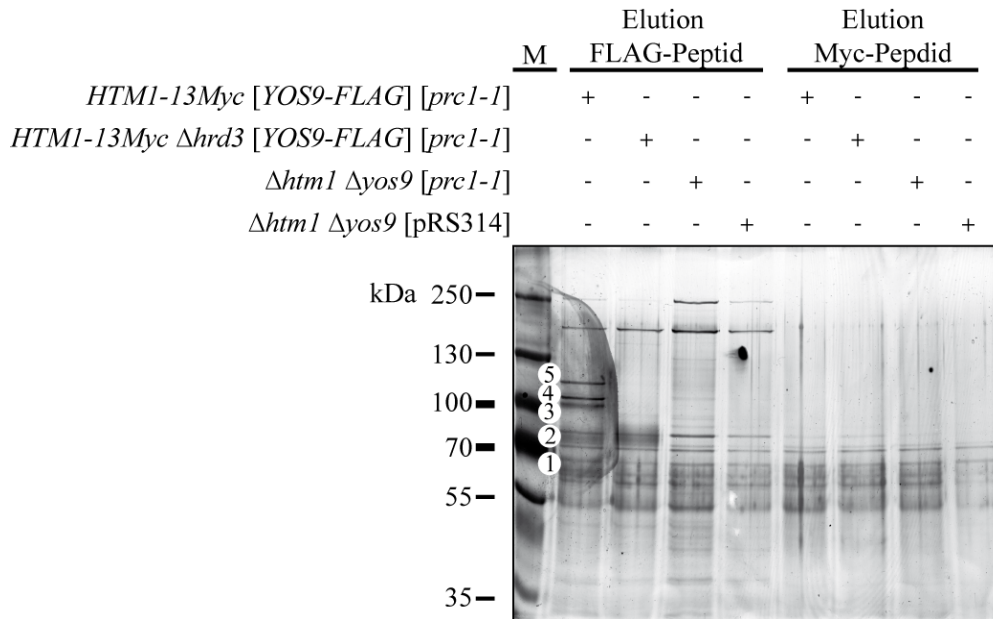
Deshalb wurde eine Co-Immunopräzipitation mit Peptidelution durchgeführt, um gezielt diese Yos9-FLAG<sub>3</sub>-Htm1-Myc<sub>13</sub>-Interaktion in den Stämmen *HTM1-13Myc* [*YOS9-FLAG*] [*prc1-1*], *HTM1-13Myc*  $\Delta$ *hrd3* [*YOS9-FLAG*] [*prc1-1*], *HTM1-13Myc* *YOS9* [*prc1-1*] und *HTM1* [*YOS9-FLAG*] [*prc1-1*] nachzuweisen (Abb. 11).

Das Ergebnis zeigt unerwartet ein immunologisches Signal in allen Stämmen auf der Höhe des Htm1-Myc<sub>13</sub>-Signals. Da aber nicht in allen verwendeten Stämmen ein Htm1-Myc<sub>13</sub> exprimiert ist, kann es sich nur um eine Kreuzreaktion des Myc-Antikörpers, mit einem unspezifisch an den Sepharosekugeln gebundenem Protein handeln. Bei der Anti-Myc-Präzipitation (Htm1-Myc<sub>13</sub>) findet man in dem Stamm, der kein Htm1-Myc<sub>13</sub> exprimiert, das schwächste Signal. Damit vergleichbar sind die Signale in der Anti-FLAG-Präzipitation (Yos9-FLAG<sub>3</sub>). Daher erkennt man in diesem Experiment keine Interaktion zwischen Yos9 und Htm1 (Abb. 11). Möglicherweise bindet Htm1 an Yos9 nur sehr schwach (Abb. 10).



**Abb. 11: Eine Yos9-Htm1 Interaktion ist nicht nachweisbar.** Die Membranproteine wurden mit Digitonin solubilisiert. Die IP erfolgte mit FLAG-Antikörpern oder mit Myc-Antikörpern und ProteinA/ProteinG-Sepharose. Die gebundenen Proteine wurden nach der Präzipitation mit FLAG-, bzw. Myc-Peptiden eluiert. Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Sepharosekügelchen „beads“ mit Probenpuffer behandelt und eine Immunodetektion durchgeführt.

Nicht alle publizierten Bindungspartner von Yos9 konnten hier immunologisch detektiert werden, da gegen einige keine Antikörper vorliegen. Es wäre auch möglich, dass sowohl Yos9 als auch Htm1 ganz andere Proteine binden. Um Hinweise darauf zu finden, wurden die Elutionsproben der ersten Co-IP (Abb. 10) noch einmal auf ein SDS-Gel aufgetragen und die enthaltenen aufgetrennten Proteine mit metallischem Silber angefärbt (Abb. 12).



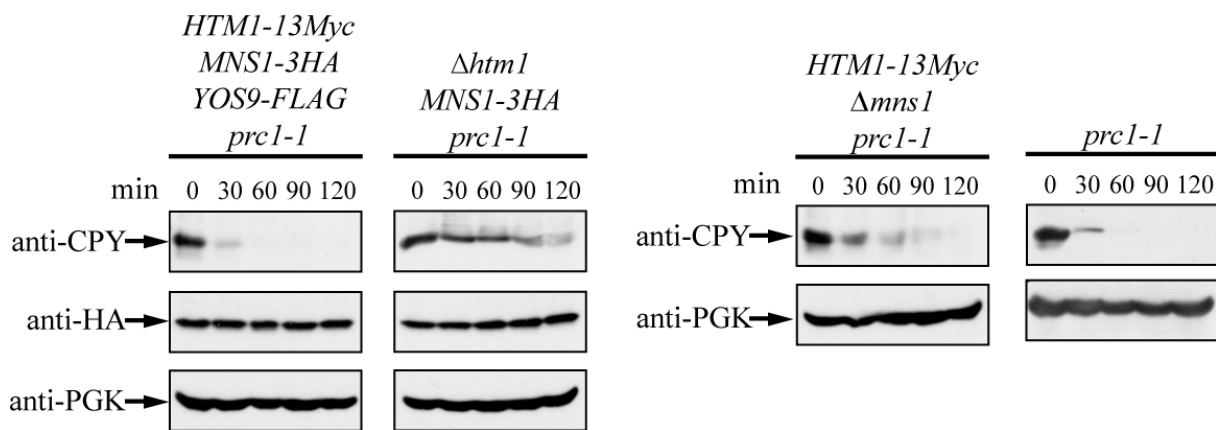
**Abb. 12: Yos9 im „Gatekeeper“-Komplex, Htm1 Immunopräzipitation zeigt keine spezifischen Banden.** Die Membranproteine wurden mit Digitonin solubilisiert. Die IP erfolgte mit FLAG-Antikörpern oder mit Myc-Antikörpern und ProteinA/ProteinG-Sepharose. Die gebundenen Proteine wurden nach der Präzipitation mit FLAG- bzw. Myc-Peptiden eluiert. Mit dem SDS-Gel wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Spezifische Protein-Banden sind nummeriert. M = Protein-Marker.

Hier finden sich bei der Htm1-Myc<sub>13</sub>-Elution keine spezifischen Banden (Abb. 12). Auch Htm1-Myc<sub>13</sub> selbst ist nicht zu erkennen, welches bei ca. 130 kDa zu erwarten wäre. Andererseits zeigen die Proben der Yos9-FLAG<sub>3</sub>-Elution im Vergleich dazu spezifische Banden, die mit Zahlen 1-5 in der Abb. 12 versehen wurden. Im Stamm *HTM1-13Myc* [*YOS9-FLAG*] [*prc1-1*] entsprechen die Höhen der Banden bei Nr. 1 dem Der3, bei Nr. 2 dem Yos9-FLAG<sub>3</sub> und bei Nr. 5 dem Cdc48 Signal im Westernblot aus Abb. 10. Bei den Banden Nr. 3 und Nr. 4 könnte es sich um die beiden Proteine Hrd3 und Usa1 handeln. Von Denic *et al.*, 2006 wurden sie als Teil des „Gatekeeper“-Komplexes und immer co-migrierend gefunden. CPY\* ist hier nicht zu erkennen, das bei 67 kDa zu erwarten wäre. Im Stamm *HTM1-13Myc* [*YOS9-FLAG*]  $\Delta$ *hrd3* [*prc1-1*] gehen viele der Bindungen des Komplexes verloren. So findet man (Abb. 12) nur noch Yos9-FLAG<sub>3</sub> als spezifische Bande im Vergleich zu der Doppeldeletion  $\Delta$ *yos9*  $\Delta$ *htm1* [pRS314].

## Htm1 und Mns1 sind keine festen Bindungspartner

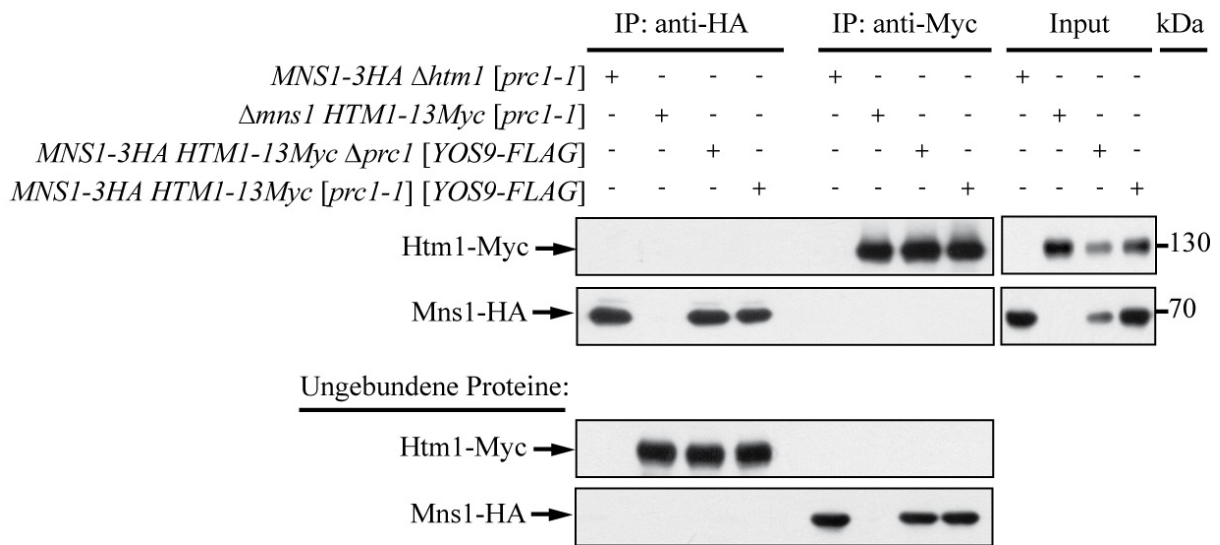
Wenn Htm1 kein Teil des „Gatekeeper“- bzw des Der3-Komplexes ist, aber die ER abhängige Degradation fehlgefalteter glykosylierter sekretorischer Proteine beschleunigt, dann könnte Htm1 vor der „Glykanstatus-Überprüfung“ und vor dem Transport zur E3-Ligase eine Funktion haben. Unklar ist auch, wie Htm1 im ER verbleiben kann, besitzt es doch keine für den Rücktransport aus dem Golgi notwendige HDEL-Sequenz am C-Terminus.

Vielleicht bindet das integrale Membranprotein Mns1, die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase, mit Htm1 in einem „Mannosidasekomplex“. Um dies zu überprüfen, wurden zweimal Co-IPs mit Peptidellution durchgeführt. Dazu wurde zunächst Mns1 chromosomal mit der 3xHA-Markierung versehen. Das resultierende Mns1-HA<sub>3</sub> ist stabil und aktiv (Abb. 13).



**Abb. 13: Die HA<sub>3</sub>-Markierung von Mns1 stört nicht ihre Aktivität.** Gezeigt wird die Abbaukinetik von CPY\* in Cycloheximid-Chase Analyse mit den Stämmen, die CPY\* Plasmid kodiert exprimieren: *MNS1-3HA HTMI-13Myc [YOS9-3FLAG] [prc1-1]*, *MNS1-3HA Δhtm1 [prc1-1]*, *HTMI-13Myc Δmns1 [prc1-1]* und *W303ΔC [prc1-1]*. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern, HA-spezifischen Antikörpern und als Ladekontrolle wurde PGK detektiert.

Die Präzipitationen wurde in den Stämmen *MNS1-3HA HTMI-13Myc Δprc1 [YOS9-3FLAG]*, *MNS1-3HA HTMI-13Myc [YOS9-3FLAG] [prc1-1]*, *MNS1-3HA Δhtm1 [prc1-1]* und *Δmns1 HTMI-13Myc [prc1-1]* durchgeführt (Abb. 14).



**Abb. 14: Htm1 bindet nicht an Mns1.** Die Membranproteine wurden mit Digitonin solubilisiert. Die IP erfolgte mit HA-Antikörpern oder mit Myc-Antikörpern und ProteinA/ProteinG-Sepharose. Die gebundenen Proteine wurden nach der Präzipitation mit HA- bzw. Myc-Peptiden eluiert. Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Htm1-Myc<sub>13</sub> präzipitiert nicht mit Mns1-HA<sub>3</sub> wie auch umgekehrt Mns1-HA<sub>3</sub> nicht mit Htm1-Myc<sub>13</sub> präzipitiert werden kann (Abb. 14). Es kann also keine Interaktion der beiden Proteine angenommen werden.

## **Teil 4: Degradationsanalysen zeigen distinkte Funktion von Htm1 und Mns1 am gleichen Substrat auf**

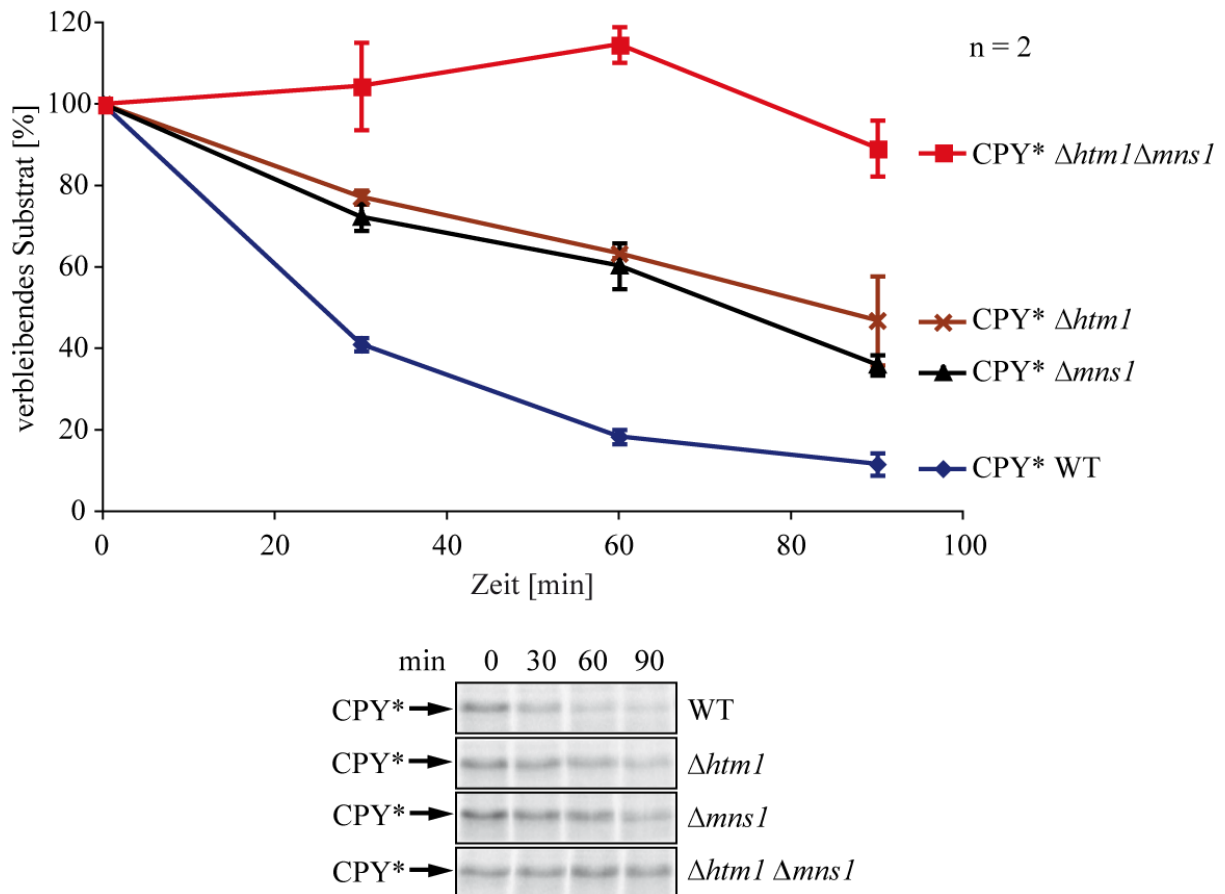
Es konnten keine Hinweise auf eine Lektin-Eigenschaft von Htm1 in dieser Arbeit gefunden werden. Auch wurde es nicht als fester Bestandteil des „Gatekeeper“- bzw. des großen Der3-Komplexes gefunden. Auf Grund der Homologie zur ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase (Mns1) könnte vermutet werden, dass Htm1 eine enzymatische Aktivität besitzt. Es könnte jedoch ein funktionaler Zusammenhang zwischen beiden Proteinen bestehen, der hier mit Degradationsanalysen untersucht wurde. Zunächst wurde Doppeldeletion der Gene *HTM1* und *MNS1* untersucht und dabei ein additiver Effekt ihrer Deletionen bezüglich des Abbaus des Substrates CPY\* festgestellt. Daraufhin wurde mit Überexpressionsexperimenten ermittelt, ob eine redundante oder distinkte Funktion der beiden Proteine vorliegt.

### **Htm1 und Mns1 besitzen eine additive Funktion in der CPY\* Degradation**

Die Auswirkung der *HTM1* und *MNS1* Einzeldelationen auf die Abbaukinetik von CPY\* wurde bereits untersucht: So verbleiben in einem *HTM1* Deletionsstamm nach 90 min noch ca. 60 % der CPY\*, wie in Pulse-Chase- und Cycloheximid-Analysen festgestellt wurde (Jakob *et al.*, 2001; Kostova and Wolf, 2005; Nakatsukasa *et al.*, 2001). Für die *MNS1* Deletion wurden unterschiedliche Werte in Bezug auf den CPY\* Abbau gefunden. So findet man nach 60 min ca. 70 % CPY\* (Bhamidipati *et al.*, 2005) und eine andere Arbeitsgruppe zeigt in einer Cycloheximid-Analyse, dass CPY\* nach 60 min schon auf unter 50 % degradiert wurde (Jakob *et al.*, 2001). Die Frage war, wie wirkt sich die Depletion beider Proteine auf die CPY\*-Degradation aus.

Das Degradationsverhalten von CPY\* sollte in Abhängigkeit der beiden Gene *HTM1* und *MNS1* in Einzel- und Doppeldeletionen untersucht werden. Dazu wurden 4 Stämme bezüglich ihres CPY\*-Degradationsverhaltens in Pulse-Chase-Analysen untersucht: die Stämme *HTM1 MNS1*, *HTM1  $\Delta$ mns1*,  *$\Delta$ htm1 MNS1* und  *$\Delta$ htm1  $\Delta$ mns1*. CPY\* wurde jeweils endogen vom Chromosom kodiert (Abb. 15).





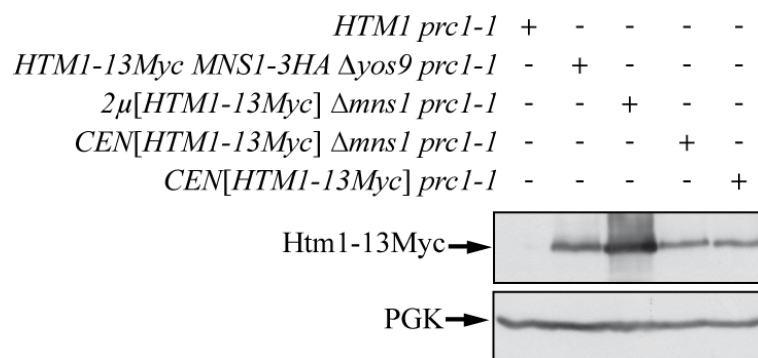
**Abb. 15: CPY\* wird in  $\Delta htm1 \Delta mns1$  Mutanten stabilisiert.** Das Diagramm und Autoradiogramm zeigt die Pulse-Chase-Analysen in den Stämmen *HTM1 MNS1*, *HTM1  $\Delta mns1$* ,  *$\Delta htm1 MNS1$*  und  *$\Delta htm1 \Delta mns1$*  mit jeweils endogen kodiertem CPY\*. Die Proben wurden in 30 min Abständen entnommen von 0 bis 90 Minuten und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. Das Autoradiogramm zeigt exemplarisch einen von zwei unabhängigen Versuchen.

In diesen Experimenten (Abb. 15) konnte ein additiver Effekt in einer  *$\Delta htm1 \Delta mns1$*  Doppelmutante hinsichtlich der CPY\*-Degradation beobachtet werden. Während in den beiden Einzeldelationen noch eine Degradation sichtbar ist, in  *$\Delta htm1$*  bis 47% und in  *$\Delta mns1$*  bis 36% der ursprünglichen CPY\*-Menge nach 90 min, wird in der Doppelmutante  *$\Delta htm1 \Delta mns1$*  CPY\* deutlich stabilisiert und ist nach 90 min noch zu 89% vorhanden. Damit haben die beiden Proteine Htm1 und Mns1 eine additive Funktion auf die CPY\*-Degradation.

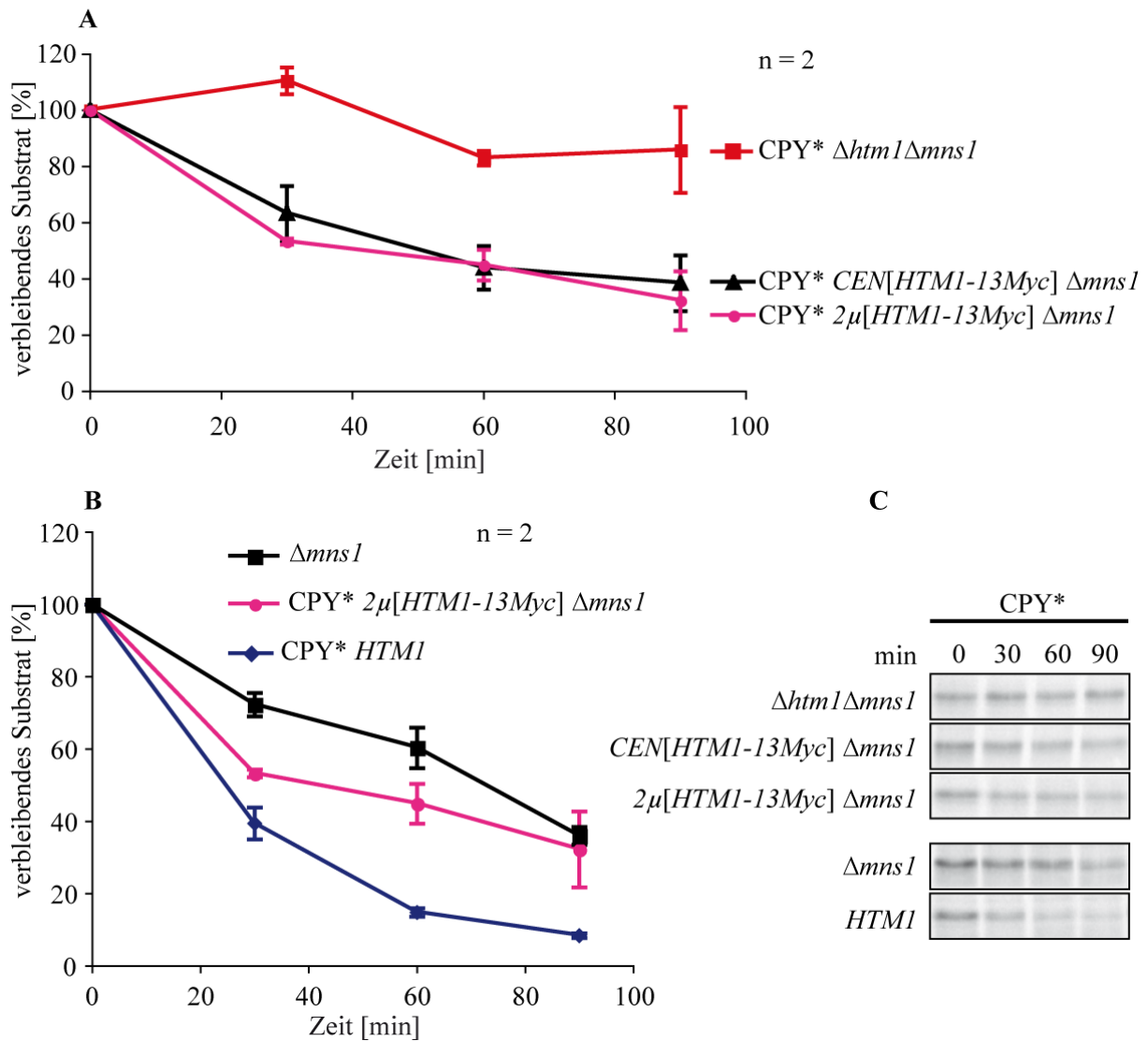
## Die Überexpression von Htm1 ändert nicht den $\Delta mns1$ -Phänotyp

Für diesen additiven Effekt wären verschiedene Gründe denkbar. Htm1 und Mns1 könnten redundante Funktionen haben. Wäre dies so, könnte die WT-ähnliche Degradation von CPY\*, in den Einzeldelektionen durch Überexpression des jeweils anderen Proteins wieder erreicht werden.

Um dies zu untersuchen, wurde zunächst die *HTM1-13Myc* Sequenz aus dem Stamm YOF31 in ein „low-copy“-Plamid und in ein „high-copy“-Plamid mit endogenem Promotor kloniert. Je eins dieser Plasmide wurde dann in verschiedene Deletionsstämme eingeschleust, eine Expressionskontrolle durchgeführt (Abb. 16) und mittels Pulse-Chase-Analysen die CPY\*-Degradation untersucht (Abb. 17).



**Abb. 16: Expressionsmenge von Htm1-Myc<sub>13</sub> in Stämmen  $2\mu$ [*HTM1-13Myc*], *CEN*[*HTM1-13Myc*] und *HTM1-13Myc*.** Alle Stämme wurden in den entsprechenden Selektionsmedien bis ca. OD<sub>600</sub> = 1 angezogen. Gleiche Zellmengen wurden einer alkalischen Lyse unterzogen und eine SDS-PAGE mit einem 8 % Gel durchgeführt. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit Myc-spezifischen Antikörpern und als Ladekontrolle wurde PGK detektiert.



**Abb. 17: Die Htm1-Myc<sub>13</sub> Überexpression kann nicht den Phänotyp der Mannosidase-Deletion  $\Delta mns1$  ausgleichen.** (A) Das Diagramm zeigt die Pulse-Chase-Analyse von den Stämmen  $\Delta htm1 \Delta mns1 prc1-1$ ,  $CEN[HTM1-13Myc] prc1-1 \Delta mns1$  und  $2\mu[HTM1-13Myc] prc1-1 \Delta mns1$ . Die Proben wurden in Abständen von 30 min von 0 bis 90 Minuten entnommen und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. (B) Das Diagramm zeigt die Pulse-Chase-Analyse von CPY\* in dem Stamm  $2\mu[HTM1-13Myc] prc1-1 \Delta mns1$  im Vergleich mit dem  $prc1-1 \Delta mns1$  Stamm aus Abb. 15 und dem WT  $HTM1 MNS1 prc1-1$  Stamm aus Abb. 19. (C) Das Autoradiogramm zeigt exemplarisch einen von zwei unabhängigen Versuchen.

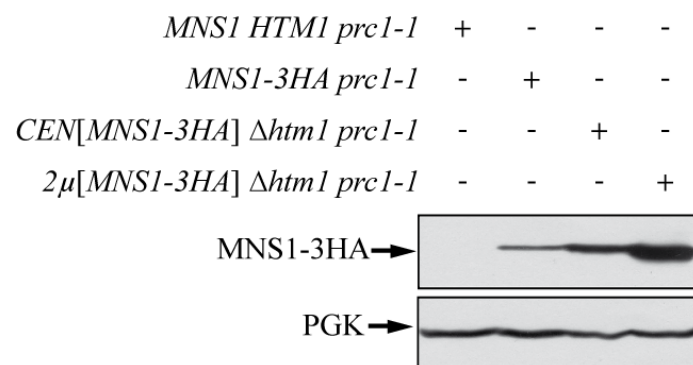
Eine Überexpression von Htm1-Myc<sub>13</sub> in einem  $\Delta htm1 \Delta mns1$  Stamm führt nicht zu einem Wildtyp ähnlichen Degradation von CPY\* (Abb. 17 B). Hier ist zwar bis 60 min eine signifikante Beschleunigung des Abbaus zu erkennen, aber nach 90 min sind die Werte annähernd gleich. Es gibt keinen Unterschied in der CPY\*-Degradation im Stamm mit „low copy“-Plasmid exprimiertem Htm1-Myc<sub>13</sub> im Vergleich mit dem Stamm mit „high copy“-

Plasmid exprimiertem Htm1-Myc<sub>13</sub> (Abb. 17 A). Eine Htm1-Myc<sub>13</sub>-Überexpression ändert somit nicht den Phänotyp einer *MNS1* Deletion.

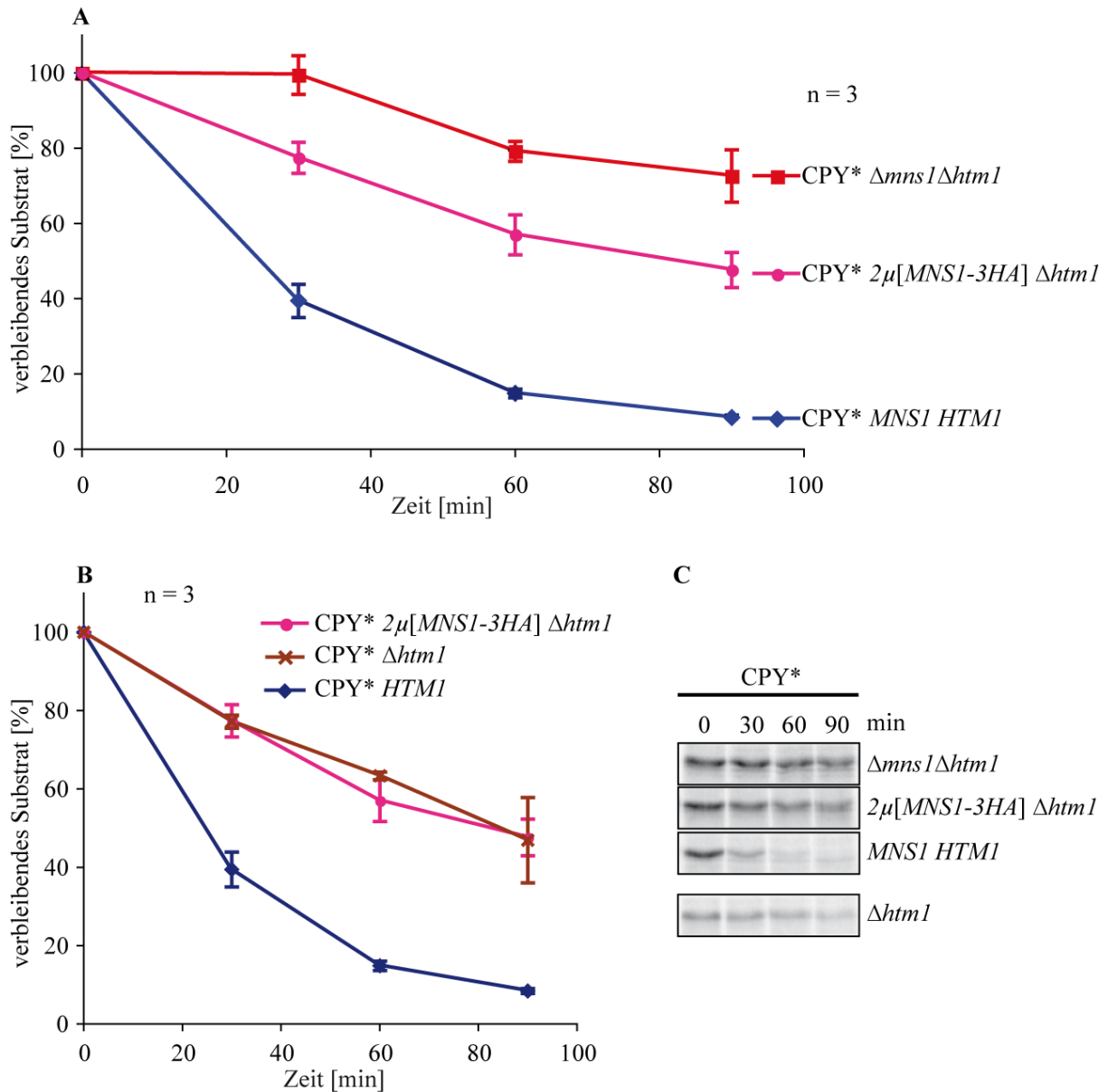
## Die Überexpression von Mns1 ändert nicht den $\Delta htm1$ -Phänotyp

Dass die Überexpression von Htm1 den  $\Delta mns1$ -Phänotyp nicht ändert, könnte auch mit einem unbekanntem, bei den Überexpressionsexperimenten nicht gleichzeitig überexprimierten Co-Faktor von Htm1 erklärt werden. Die ER- $\alpha$ ,2-Mannosidase dagegen ist ein Enzym, das auch *in vitro* ohne weitere Genprodukte ihre Aktivität besitzt (Herscovics *et al.*, 2002; Jelinek-Kelly and Herscovics, 1988). Deshalb könnte eine Überexpression von Mns1 in einer *HTM1* Deletion möglicherweise die Wildtyp ähnliche Degradation von CPY\* wieder herstellen.

Um dies zu untersuchen wurde zunächst die komplementierende *MNS1-3HA* Sequenz aus dem Stamm YOF81 in ein „low-copy“-Plamid und in ein „high-copy“-Plamid mit endogenem Promotor kloniert (p3MNS1HA, p4MNS1HA, Konrad Otte und Alexandra Stolz). Je eines dieser Plasmide wurde dann in den  $\Delta mns1 \Delta htm1$  Stamm eingeschleust, eine Expressionskontrolle durchgeführt (Abb. 18) und mittels Pulse-Chase-Analysen ihr Einfluss auf die CPY\*-Degradation hin untersucht (Abb. 19).



**Abb. 18: Expressionsmenge von Mns1-HA<sub>3</sub> in Stämmen 2 $\mu$ [MNS1-3HA], CEN[MNS1-3HA] und MNS1-3HA.** Alle Stämme wurden in den entsprechenden Selektionsmedien bis ca. OD<sub>600</sub> = 1 angezogen. Gleiche Zellmengen wurden einer alkalischen Lyse unterzogen und eine SDS-PAGE mit einem 8 % Gel durchgeführt. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit HA-spezifischen Antikörpern und als Ladekontrolle wurde PGK detektiert.



**Abb. 19: Eine Mns1-HA<sub>3</sub> Überexpression kann nicht den Phänotyp der HTM1-Deletion  $\Delta htm1$  ausgleichen.** (A) Das Diagramm zeigt die Pulse-Chase-Analyse von den Stämmen  $\Delta htm1 \Delta mns1 prc1-1$ ,  $2\mu[MNS1-3HA] \Delta htm1 prc1-1$  und dem WT  $MNS1 HTM1 prc1-1$ . Die Proben wurden in Abständen 30 min von 0 bis 90 Minuten entnommen und die Immunopräzipitation erfolgte mit CPY-spezifischen Antikörpern. (C) Das Diagramm zeigt die Pulse-Chase-Analyse von dem Stamm  $2\mu[MNS1-3HA] prc1-1 \Delta htm1$  im Vergleich mit dem  $prc1-1 \Delta htm1$  aus Abb. 15 und dem WT  $MNS1 HTM1 prc1-1$ . (B) Das Autoradiogramm zeigt exemplarisch einen von drei unabhängigen Versuchen.

Eine Überexpression von Mns1-HA<sub>3</sub> in einem  $\Delta htm1 \Delta mns1$  Stamm führt nicht zu einem Wildtyp ähnlichen Degradationsverhalten von CPY\* (Abb. 19). Die Überexpression von Mns1-HA<sub>3</sub> ändert somit nicht den Phänotyp einer HTM1 Deletion. Die beiden Proteine haben unterschiedliche Funktion in der Degradation von dem ERAD-L-Substrat CPY\*.

## Diskussion

### ***Unglykosyliertes CPY\* ist ein ERAD-Substrat***

Carboxypeptidase yscY (CPY) ist ein sekretorisches Protein, das durch eine Punktmutation (G255R) zum ERAD-Substrat (CPY\*) mit einer Halbwertszeit von unter 20 min wird (Finger *et al.*, 1993). CPY\*0000 ist zusätzlich durch Mutationen (T15A, N87I, N168Q, N368Q) in den 4 Konsensussequenzen ein vollständig unglykosyliertes Protein, welches in WT-Zellen nur noch stark verzögert mit einer Halbwertszeit von über 90 min degradiert wird (Knop *et al.*, 1996b; Kostova and Wolf, 2005). Diese Daten zeigen damit auch noch eine deutliche Degradation von CPY\* ohne Glykanstrukturen. Allerdings könnte CPY\*0000 über einen anderen Weg als über den ERAD-Weg abgebaut werden. Denkbar wäre z.B. Autophagozytose von ER-Teilen mit einer *PEP4*-abhängigen vakuolären Proteolyse (Bernales *et al.*, 2006; Kruse *et al.*, 2006; Rupp and Wolf, 1995; Yorimitsu and Klionsky, 2007). Auch werden vereinzelt sekretorische Modell-Proteine, die im ER aufgrund von Mutationen keine native Konformation einnehmen können, dennoch über den sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert und dort *PEP4*-abhängig degradiert; gezeigt wurde dies für ein Fusionsprotein bestehend aus einer mutierten, thermodynamisch instabilen Form des  $\lambda$ -Repressorproteins mit der Hefe-Invertase Suc2 (Hong *et al.*, 1996) und mit der mutierten Form des  $\alpha$ -Faktor Rezeptors Ste2\* (Jenness *et al.*, 1997). Für die Degradation von CPY\*0000 konnte in Pulse-Chase-Analysen keine Abhängigkeit von den vakuolären Proteinasen Pep4, Prb1 und CPY gefunden werden (Abb. 5). Es wird keine weitere Stabilisierung als die in den Wildtypzellen gefunden. Auch spricht gegen eine vakuoläre Proteolyse von CPY\*0000 das Ergebnis der Pulse-Chase-Analyse in einer Proteasommutanten (Abb. 6): In dieser wird CPY\*0000 deutlich stabilisiert. Wie bereits die Stabilisierung von CPY\*0000 in Proteasomenmutanten andeuten, wird die unglykosylierte Variante von CPY\* auch über den ERAD-Weg abgebaut: Während im Wildtypstamm CPY\*0000 nach 90 min zu 40 % abgebaut wird (Kostova and Wolf, 2005), wird das Substrat im Deletionsstamm  $\Delta der3$ , dem die für die CPY\*-Degradation notwendige E3-Ubiquitin-Ligase fehlt (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Vashist and Ng, 2004), nicht degradiert (Abb. 7). Damit ist auch CPY\*0000 ein ERAD-Substrat. Auch CPY\* wird im Deletionsstamm  $\Delta der3$ , unter den hier verwendeten Bedingungen, nicht degradiert (Abb. 7). Es konnte hier kein signifikanter Unterschied zum Abbau von CPY\*0000 im  $\Delta der3$  Deletionsstamm gefunden werden. Daher lassen sich die Beobachtung von Haynes *et al.*,

2002 nicht bestätigen, die einen partiellen Abbau von CPY\* im  $\Delta der3$  Deletionsstamm gezeigt haben und daraus folgerten, dass es noch einen „Notweg“ für fehlgefaltete sekretorische Proteine geben müsse (Haynes *et al.*, 2002). In jener Studie konnte im  $\Delta der3$  Deletionsstamm durch Überexpression von CPY\* dieser „Notweg“, der sogenannten „Hrd1 independent-proteolysis“, HIP-Weg, induziert und eine Abbau von CPY\* in Wildtyp-ähnlicher Degradationsrate beobachtet werden. Da aber CPY\* und CPY\*0000 im  $\Delta der3$  Deletionsstamm nicht mehr degradiert werden (Abb. 7), wird der HIP-Weg bei einem nativen Expressionsspiegel der missgefalteten Proteine offensichtlich nicht induziert. Interessant sind die Ergebnisse über den Abbau von CPY\*0000 auch im Hinblick auf andere unglykosylierte sekretorische Proteine, deren ER abhängige Qualitätskontrolle immer noch Fragen aufwirft (siehe Einleitung). Ein solches mit CPY\*0000 vergleichbares unglykosyliertes lösliches luminales ERQC-Substrat ist eine mutierte Version des prepro- $\alpha$ -Faktors  $\Delta Gpp\alpha F$  (oder kurz  $\alpha F$ ), das *in vitro* unabhängig von Cdc48/Ufd1/Npl4 proteasomal abgebaut und nicht ubiquitiniert wird (Lee *et al.*, 2004). Für dessen Abbau wird wegen fehlender Abhängigkeit von den ERAD-L-Komponenten Cdc48/Ufd1/Npl4, Der1, und Htm1 und nicht nachgewiesener Ubiquitinierung bisher ein Sonderweg vermutet (Sayeed and Ng, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte nun auch *in vivo* die E3-Ubiquitinligase Der3 abhängige Degradation eines unglykosylierten löslichen luminalen ERQC-Substrat gezeigt werden.

Wenn CPY\* und CPY\*0000 den gleichen Weg der Degradation haben, dann entscheiden die Glykane offensichtlich nicht über den Weg, sondern nur über die Geschwindigkeit der Degradation. CPY\* wird ohne Glykane (CPY\*0000) mehr als vier Mal langsamer degradiert (Kostova and Wolf, 2005), aber nicht über einen anderen Weg (Abb. 5 bis 7). Geht man davon aus, dass die Zelle außer der Chaperon-Erkennung hydrophober Bereiche am Protein, ohne die Prozessierung von Glykanen keine weitere Möglichkeit hat, die Verweildauer eines sekretorischen Proteins im ER zu bestimmen, um darüber zu entscheiden, ob ein solches Protein irreversibel fehlgefaltet ist, so muss diese Erkennung der potentiell schädlichen ungefalteten Proteine dennoch geschehen. Man könnte spekulieren, dass die Dauer, wie lange hydrophobe Bereiche am Protein an der Oberfläche bleiben, bestimmt, ob sie abgebaut werden oder nicht. Hier spielen wahrscheinlich das Hsp70 Chaperon Kar2 und Hrd3 eine Rolle. Hrd3 ist stöchiometrisch an Der3 gebunden und ist zusammen mit Kar2 und Yos9 ein Teil des „Gatekeeper“-Komplexes (siehe Einleitung). Denic *et al.*, 2006 konnten zeigen, dass Hrd3 unabhängig von Yos9 CPY\* und CPY\*0000 bindet. T. Sommer, MDC, Berlin konnte nun zeigen, dass auch Wildtyp CPY an Hrd3 bindet und nach Faltung von dort in den

sekretorischen Weg „entlassen“ wird (T. Sommer, mündliche Mitteilung). Die Idee könnte sein, dass alles was länger als eine bestimmte Zeit an Hrd3 bindet, allmählich an der Der3 übergeben wird zwecks Proteolyse. Der Abbau von CPY\*0000 in Wildtyp mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 90$  min (Kostova and Wolf, 2005) zeigt hiernach eine „Basis-Degradation“ missgefalteter Proteine, d.h. eine andauernde aber kinetisch langsame Degradationsaktivität. Diese geringe Aktivität könnte ein optimales Zeitfenster festlegen, so dass einerseits der größte Teil der neusynthetisierten sekretorischen Proteine ihre native Konformation erreichen und das ER über den sekretorischen Weg verlassen können, andererseits sich aber auch nicht zu viele ungefaltete Proteine im ER ansammeln kann.

### ***Usa1-Funktion ist abhängig vom Stammhintergrund***

Usa1 ist ein Transmembran-Protein mit einer Ubiquitin-ähnlichen Domäne. In *in vivo* Immunopräzipitationsexperimenten findet man Usa1 als Bestandteil des großen Komplexes um die E3-Ligase Der3 zusammen mit Cdc48, Ubx2, Der1, Hrd3, Kar2 und Yos9 (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006). Usa1 bindet sowohl CPY\* als auch CPY\*0000 (Denic *et al.*, 2006). Die genaue Funktion von Usa1 im ERAD ist unklar (siehe Einleitung). Eine Studie sieht Usa1 zusammen mit Der1 als notwendige Komponente nur für bestimmte ERAD-Substrate, die eine ER lumenale Fehlfaltung aufweisen und durch Der3 ubiquitiniert werden (Carvalho *et al.*, 2006). Dieser Studie zufolge ist dies bei Substraten wie KHN, KWW und CPY\* der Fall. Die Studie nennt den Usa1 und Der1 abhängigen Abbauweg ERAD-L (L für lumenal). Fehlgefaltete Membranproteine, die durch Der3 ubiquitiniert werden, aber eine Fehlfaltung in der Membran aufweisen, wie Hmg2, Sec61-2 und Pdr5\* werden Usa1 und Der1 unabhängig degradiert und diesen Weg als ERAD-M-Weg (für Membran) bezeichnet. Im Gegensatz zu diesem Modell stehen Beobachtungen aus anderen Experimenten: In einem genomweiten Wachstumstest wurde ein Hinweis auf Usa1 abhängigen Abbau von einem Sec61-2-Derivat mit einer zytosolischen Leu2-Domäne (Sec61-2L) gefunden (Kohlmann, 2007). Ein anderes Membranprotein CTG\*, das eine lumenale CPY\*-Domäne aufweist, die ursächlich für die ER abhängige Degradation ist, wird unabhängig von Der1 (Taxis *et al.*, 2003) und auch unabhängig von Usa1 abgebaut (Hisashi Hoshida, mündliche Mitteilung). Nach der Klassifizierung von Carvalho *et al.* müsste CTG\* dann ein ERAD-M-Substrat sein. Das aber widerspricht der Modellvorstellung von Carvalho *et al.*, dass ERAD-M-Substrate eine Fehlfaltungsursache in der Membrandomäne aufweisen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind in unterschiedlichen Stammhintergründen der jeweiligen Arbeitsgruppen



beobachtet worden. So beruhen die Ergebnisse von Carvalho *et al.* auf Arbeiten mit dem Hefestamm BY4730. Die Ergebnisse von Taxis *et al.* und Hisashi Hoshida wurden im W303-Stamm erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde wiederum eine Usa1 Abhängigkeit der CTG\* Degradation in einem weiteren Stammhintergrund DF5 gefunden (Abb. 8). Also ist Usa1 für die Degradation von CTG\* je nach Stammhintergrund notwendig oder nicht und eignet sich daher nicht für eine allgemein gültige Unterscheidung des Der3 abhängigen ERADs in ERAD-L- und -M-Weg. Die Funktion von Usa1 ist im DF5 Hefestammhintergrund für den Abbau von CTG\* erforderlich (Abb. 8) aber in W303 dagegen nicht. In W303 muss diese Funktion dann für den CTG\* Abbau verloren gegangen sein oder wird von anderen Komponenten übernommen. Trotzdem ist Usa1 noch sowohl in W303 (Hisashi Hoshida, mündliche Mitteilung) sowie in BY4730 für die Degradation von CPY\* eine notwendige Komponente (Carvalho *et al.*, 2006). Um eindeutige Resultate über die Funktion von Usa1 zu bekommen sollten noch weitere Studien mit Usa1 in verschiedenen genetischen Stammhintergründen durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre ein genetischer „Screen“ nach Genen, die in der Lage sind eine  $\Delta usa1$  Deletion zu komplementieren.

### **Interaktionsstudien mit den Lektinen Yos9 und Htm1**

Sekretorische Glykoproteine werden während des Imports in das ER vom OST-Komplex mit Glykanen der Struktur  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  über den Asparagin-Stickstoff in der Konsensussequenz N-X-S/T verbunden (wobei X für jede Aminosäure außer Prolin steht). Im ER beginnen sofort zwei Glucosidasen, aber kinetisch relativ langsam, die drei äußeren Glucosen zu entfernen. Erreicht das Sekretprotein seine native Struktur bevor die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase Zugriff auf eine mittlere Mannose bekommt und das Glykan zur Struktur  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$  reduziert, dann kann das sekretorische Protein zum Golgi und von dort aus zum Zielort gelangen. Erreicht es die native Struktur nicht innerhalb dieses Zeitraums, so wird es von der ER-assoziierten Degradation abgebaut. Dieses Modell des „Time-Trimming“ erklärt wie zwischen korrekt gefalteten und fehlgefalteten Sekretorischen Proteinen im ERQC unterschieden wird (Jakob *et al.*, 1998).

Yos9 und Htm1 sind aufgrund ihrer Sequenzhomologie zum Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bzw. zur Mannosidase zwei potentielle Lektine im ER, die an der Glykanstruktur  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$  die endgültig misslungene Fehlfaltung erkennen könnten, um die ER assoziierte Degradation dieser sekretorischen Proteine zu initiieren. Genetische Experimente

zeigten, dass der Abbau des vierfach glykosylierten ERAD-Substrats CPY\* von Yos9 und von Htm1 abhängt (Buschhorn *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 2001; Nakatsukasa *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit konnte in Yos9-FLAG<sub>3</sub>-Präzipitationsexperimenten CPY\* als Bindungspartner identifiziert werden (Abb. 10). In diesen Experimenten konnten des Weiteren eine Interaktion von Yos9-FLAG<sub>3</sub> zu den ERAD-Komponenten Cdc48 und Der3 gefunden werden, die in  $\Delta hrd3$  wieder verloren gehen (Abb. 10). Die Interaktion zwischen Yos9 und seinem Substrat CPY\* ist aber HRD3-unabhängig. Damit kann eine indirekte Bindung von Yos9 mit CPY\* über Hrd3 ausgeschlossen werden. Diese Daten wurden von anderen Gruppen im Laufe dieser Arbeit bestätigt und erweitert. Danach ist Yos9 Teil eines großen Komplexes um die E3-Ligase Der3, bestehend aus Cdc48, Ubx2, Usa1, Der1, Der3, Hrd3, Kar2 und Yos9 (Bhamidipati *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Gauss *et al.*, 2006b). Auch bei Verlust von Der3 findet man noch einen Unterkomplex Kar2p/Hrd3p/Yos9 (Denic *et al.*, 2006). Yos9 bindet CPY\* mit der Glykan-Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> und GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>, aber nicht GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>6</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub> oder GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>; Yos9 bindet aber auch CPY\*0000 (Szathmary *et al.*, 2005). Damit könnte Yos9 das gesuchte Lektin im „Time-Trimming“-Modell sein. Yos9 bindet zwar auch unglykosylierte Substrate und bindet sie, auch wenn die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor Domäne mutiert ist, da aber nur Substrate mit den Glykanstrukturen GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> und GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> schnell degradiert werden, kommt dem Yos9 eine „Türsteher“-Funktion zu („Gatekeeper“) (Bhamidipati *et al.*, 2005; Denic *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte auch ein Htm1-Myc<sub>13</sub>-Signal in der Yos9-FLAG<sub>3</sub>-Präzipitation gefunden werden (Abb. 10). Eine Bindung zwischen den beiden potentiellen Lektinen konnte aber von Htm1-Myc<sub>13</sub>-Seite her nicht eindeutig bestätigt werden (Abb. 11). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass hier Yos9-FLAG<sub>3</sub> durch Htm1-Myc<sub>13</sub> präzipitiert wurde. Andererseits könnte das Htm1-Myc<sub>13</sub>-Signal der ersten Co-IP (Abb. 10) auch nur unspezifisch sein. Andere Gruppen haben ebenfalls ohne Erfolg versucht eine Interaktion zwischen Htm1 und Yos9 nachzuweisen (Denic *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Szathmary *et al.*, 2005). Htm1 besitzt kein K/HDEL-Motiv, ein Rücktransportsignal aus dem Golgi, dennoch findet man überexprimiertes Htm1 in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ausschließlich im ER (Nakatsukasa *et al.*, 2001). Möglicherweise bindet Htm1 stöchiometrisch an einem anderen Protein, welches im ER Lumen gehalten wird. Solche Bindungspartner von Htm1 wurden mit Silber gefärbte Proteine in SDS-Gelen von der Htm1-Myc<sub>13</sub>-Präzipitation allerdings nicht gefunden (Abb. 12). Die Methode ist eventuell nicht empfindlich genug, da auch Htm1 in den Silber-

gefärbten SDS-Gelen nicht indentifizierbar ist. Das integrale Membranprotein Mns1, die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase, könnte vielleicht mit Htm1 einen „Mannosidasekomplex“ bilden. In einer Co-IP mit Htm1-Myc<sub>13</sub> und Mns1-HA<sub>3</sub> konnte allerdings keine Bindung der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abb. 14).

### **Genetische Zusammenhänge in Degradationsanalysen zeigen distinkte Funktionen von Htm1 und Mns1 an CPY\* auf**

Htm1 beschleunigt den Abbau von glykosylierten ERAD-Substraten wie CPY\*, KHN, KWW, Pdr5\*, CFTR, und PrA\*. Keinen Einfluss auf die Abbaurate hat Htm1 auf unglykosylierte Substrate wie CPY\*0000, KWS, Sec61-2, und  $\Delta$ Gp $\alpha$ F (Gnann *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Kostova and Wolf, 2005; Nakatsukasa *et al.*, 2001; Spear and Ng, 2005; Vashist and Ng, 2004). Es muss mindestens ein Glykan am Substrat vorhanden sein, um einen Unterschied in der Abbaukinetik von WT- und *HTM1*-Deletionsstamm zu finden (Kostova and Wolf, 2005). Allerdings ist es bisher weder in dieser Arbeit (Abb. 10) noch in der Literatur dokumentiert gelungen, eine Interaktion von Htm1 mit seinen Substraten nachzuweisen. Damit fehlt der wichtigste Beweis für die Lektineigenschaft von Htm1. Htm1 ist kein stöchiometrischer Bestandteil des großen Komplexes um die E3-Ubiquitinligase Der3 (siehe Einleitung). Dennoch wurden in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine mögliche Bindung von Htm1 mit dem Der3-Komplex über Yos9 gefunden (Abb. 10). Eventuell bindet Htm1 nur kurzzeitig und indirekt mit Yos9. Eine Doppeldeletionsmutante mit fehlendem *HTM1* und *YOS9* zeigte keine weitere Stabilisierung gegenüber den jeweiligen Einzeldelationen. Dies könnte darauf hindeuten, dass beide Proteine im gleichen Prozessweg beteiligt sind, aber nicht die gleiche Funktion haben (Buschhorn *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Szathmary *et al.*, 2005). Zusammengenommen ist es eher wahrscheinlich, dass Htm1 eine Funktion vor der „Gatekeeper“-Funktion zur Überprüfung der Glykanstruktur besitzt und auch nicht weiter abwärts für die Retrotranslokation oder für die Ubiquitinierung von seinen Substraten notwendig ist. Wenn Htm1 weder für die Erkennung, noch für die Zuführung zum Abbau erforderlich ist, dann möglicherweise für einen davor stattfindenden Prozess, der Entscheidung zum Abbau von endgültig fehlgefalteten glykosylierten sekretorischen Proteinen. Auf dieser Ebene der Entscheidung wird die ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase Mns1 vermutet, die durch ihre Aktivität Glykane von GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> auf GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> trimmt, ein Signal an den Substraten, das zum raschen Abbau führt (Jakob *et al.*, 1998). Eine Degradationsanalyse zeigt einen additiven Effekt der Doppelmutante  $\Delta$ *htm1*

*Δmns1* (Abb. 15) hinsichtlich der CPY\*-Degradation gegenüber den Einzeldelationen. CPY\* ist in *Δhtm1 Δmns1* Zellen erheblich stabilisiert. Dies wurde in sieben unabhängigen Experimenten beobachtet (Abb. 15, Abb. 17 und Abb. 19). Htm1 und Mns1 besitzen also jeweils eine beschleunigende Funktion auf die CPY\*-Degradation, die sich in Wildtypzellen addiert. Das Fehlen beider Proteine bewirkt einen fast vollständigen Ausfall der Degradation von CPY\* (Abb. 15). Daher ist die Kombination der Funktionen von Htm1 und Mns1 essentiell für eine effektive CPY\*-Degradation. Die beiden Proteine interagieren nicht miteinander (Abb. 14). Es ist deshalb auszuschließen, dass Htm1 eventuell nur einen Co-Faktor von Mns1 darstellt. Dies schließen auch *in vitro* Mns1-Aktivitätsexperimente aus, die ohne Htm1 durchgeführt wurden (Herscovics *et al.*, 2002). Htm1 könnte aufgrund seiner Homologie zur ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase eine Mannosidaseaktivität besitzen. Dagegen steht eine HPLC-Untersuchung mit Peptid-N-Glykosidase F abgetrennten und  $^3\text{H}$ -markierten Glykanen von CPY\* aus *Δmns1*-Zellen, die eine  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9$ -Struktur aufweisen, Glykane aus WT-Zellen und *Δhtm1*-Zellen dagegen die  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ -Struktur (Jakob *et al.*, 2001). Möglicherweise wurden bei dieser Methode nur angehäuften Zwischenprodukte detektiert, nicht aber die wahre Struktur der Glykane, die zum raschen Abbau der Proteine führt. Der additive Effekt von Htm1 und Mns1 (Abb. 15) könnte mit einer redundanten Funktion der beiden Proteine erklärt werden. Allerdings ändert die Überexpression von Htm1 nicht den *Δmns1*-Phänotyp (Abb. 17 C). Genauso ändert die Überexpression von Mns1 nicht den *Δhtm1*-Phänotyp (Abb. 19 C). Daher kann man eine redundante Funktion der beiden Proteine ausschließen. Also müssen Htm1 und Mns1 verschiedene Aktivitäten haben. Da die Substrate von beiden nur Glykoproteine sind, beide eine Mannosidasedomäne besitzen und einen additiven Effekt aufweisen, besitzt Htm1 wahrscheinlich eine zu Mns1 anders geartete, Abbausignal setzende Aktivität an den Mannosen von Glykanen der sekretorischen Proteine.

Neueste Studien bestätigen diese Vermutung (Clerc *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2008). Den ersten Hinweis auf eine potentielle Mannosidaseaktivität von Htm1 fanden Quan *et al.*, 2008 bei der *in vitro* Untersuchung, welche Glykanstrukturen von Yos9 gebunden werden in Abhängigkeit der MRH-Domäne. Dabei stellte sich heraus, dass dies nur Glykane sind, die einen freien  $\alpha$ 1,6-Mannosylrest an den äußeren Enden der Glykane präsentieren. Diese  $\alpha$ 1,6-gebundenen Mannosen sind nur im C-Zweig der Mannosestruktur (vgl. Abb. 4) zu finden und werden durch Entfernen von mindestens einer Mannose von diesem C-Zweig freigelegt. Quan *et al.* beobachteten in Zellen mit *Δalg9* Deletion und Alg12 Überexpression, die artifiziell ein Glykan an CPY\* mit  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_7$ -Struktur mit freiem  $\alpha$ 1,6-Mannosylrest erzeugen, dass

Htm1 keinen Einfluss mehr auf den Abbau von CPY\* hat. Sie vermuten daher, dass Htm1 in Wildtypzellen eine Mannose am C-Zweig entfernt. Eine neuere Studie beschreibt Htm1 nun tatsächlich als ER- $\alpha$ 1,2-exo-Mannosidase (Clerc *et al.*, 2009): Htm1 prozessiert Glykane an Proteinen von GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub> zu GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub>, nachdem Mns1 eine Mannose im B-Zweig aus der Glykan-Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> entfernt hat; auf ERAD-Substrate mit Glykanen der Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>, wie sie in  $\Delta$ *mns1* Zellen zu finden sind, hat Htm1 nur noch eine auf ca. ein Viertel reduzierte Aktivität. Hier kann vermutet werden, dass Htm1 eine GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>8</sub>-Struktur prozessiert, also eine Mannose aus dem C-Zweig der Mannose-Struktur entfernt und damit ebenfalls ein freien  $\alpha$ 1,6-Mannosylrest an den Glykanen von Proteinen erzeugt. Ebenso finden Clerc *et al.*, die Notwendigkeit eines freien  $\alpha$ 1,6-Mannosylrest für einen effiziente ERAD Prozess. Eine neue Studie in Säugerzellen zeigt ebenfalls, dass hOS-9 mit seiner MRH-Domäne nur Glykane mit freiem  $\alpha$ 1,6-Mannosylrest bindet und dass EDEM3 (homolog zu Htm1) diese Struktur prozessiert (Hosokawa *et al.*, 2009).

Betrachtet man diese neuen Daten zusammen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, so kann folgendes Modell vorgeschlagen werden:

Bei diesem Modell wird für Hrd3 eine Schlüsselfunktion in der ER-abhängigen Qualitätskontrolle und der mit ihr verbundenen ER-abhängigen Degradation angenommen. Zusammen mit zahlreichen Sensor-Proteinen erkennt und bestimmt es über die an ihm gebundenen sekretorischen Proteinen, ob sie weiter den sekretorischen Weg durchlaufen können oder degradiert werden.

Hrd3 ist ein Teil eines großen Komplexes, bestehend aus den zytosolischen Komponenten Cdc48 und Ubx2, den ER-Membranproteinen Usa1 und Der1, der E3-Ubiquitin-Ligase Der3, dem ER-lumenalem Hsp70 Chaperon Kar2 und dem ER luminalen Lektin Yos9 (Bhamidipati *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Gauss *et al.*, 2006a; Gauss *et al.*, 2006b). Neu synthetisierte sekretorische Proteine werden vermutlich zunächst an Hrd3 gebunden. Gezeigt wurde dies für das lösliche, glykosylierte, sekretorische ERAD-Modell-Substrat CPY\* und das lösliche, unglykosylierte, sekretorische ERAD-Modell-Substrat CPY\*0000 (Denic *et al.*, 2006). Aber auch Wildtyp CPY bindet zunächst an Hrd3 (T. Sommer, mündliche Mitteilung). Vermutlich ist Hrd3 der „Ort der Faltung“ sekretorischer Proteine. Von nun an wird der Verlauf der Reifung des sekretorischen Proteins überprüft. Hrd3 kann eigene Domänen besitzen, die als Sensoren für den Zustand der an ihm gebundenen Proteinen dienen oder

andere Komponenten übermitteln Signale über diesen Zustand an Hrd3. Von letzterem wird in diesem Modell ausgegangen. Das ER-lumenale Hsp70 Chaperon Kar2 übermittelt an Hrd3, ob noch hydrophobe Bereiche an der Oberfläche vom Protein vorhanden sind. Sind diese hydrophoben Bereiche nicht mehr vorhanden, „entlässt“ Hrd3 das Protein, das weiter den sekretorischen Weg durchlaufen kann. Bleiben weiter hydrophobe Bereiche an der Oberfläche vom Protein, übergibt Hrd3 das Protein allmählich der E3-Ubiquitin-Ligase zwecks Proteolyse mit einer Halbwertszeit von ca.  $t_{1/2} = 90$  min. Diese andauernde aber kinetisch langsame, bei dem Abbau des fehlgefalteten, unglykosylierten, sekretorischen Proteins CPY\*0000 gefundene Degradationsaktivität, ist vermutlich eine „Basis-Degradation“ missgefalteter Proteine (s.o.). Glykane an Glykoproteinen beschleunigen die Erkennung von Fehlfaltungen, weshalb CPY\* in Wildtypzellen mit einer Halbwertszeit von ca.  $t_{1/2} = 20$  min abgebaut wird (siehe Einleitung). Die „Sensor-Proteine“ für Hrd3 im Falle von glykosylierten sekretorischen Proteinen, sind vermutlich die Glucosidasen Gls1 und Gls2 und die Mannosidase Mns1. Möglich ist, dass Hrd3 bei einem Kontakt zu den Glucosidasen die „Basis-Degradation“ zunächst abschaltet und entweder auf den Kontakt zu Mns1 wartet, das eine Mannose im B-Zweig der Glykane des Proteins entfernt und damit ein endgültiges Missslingen der Faltung des Substrates signalisiert oder das Lektin Yos9 übermittelt dieses Signal durch die Erkennung eines freiem  $\alpha$ 1,6-Mannosylrest am C-Zweig der Glykane des Proteins. Jedes einzelne Signal aktiviert die „Basis-Degradation“ wie der Abbau von CPY\* in den Einzeldelationen von *MNS1* und *HTM1* zeigt (Abb. 15). Erhält Hrd3 dagegen beide Signale, von Mns1 und von Yos9 solange auch noch Kar2 hydrophobe Bereiche an den Proteinen signalisiert, so wird das an Hrd3 gebundene Protein sofort zwecks Proteolyse an Der3 übergeben, wie es der Abbau von CPY\* in Wildtypzellen zeigt (Abb. 15). Erhält dagegen Hrd3 keines der beiden Signale, so verhindert Hrd3 den Abbau der Proteine wie es der additive Effekt beim Abbau von CPY\* in  $\Delta$ *htm1*  $\Delta$ *mns1* Zellen anzeigt (Abb. 15). Dies ist möglicherweise ein Schutz vor vorzeitigem Abbau von sekretorischen Proteinen durch die ERAD-Maschinerie. Denn durch das Ausbleiben der beiden Mannosidasen Mns1 und Htm1 signalisiert die zurückbleibende Glykan-Struktur GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> an den Proteinen eine falsche Zeit, die das Protein hatte, um zu falten. Und diese Zeit ist in Hinblick auf die rasche Degradation von CPY\* in Wildtypzellen normalerweise vermutlich sehr kurz. Durch die  $\Delta$ *htm1*  $\Delta$ *mns1* Doppeldeletion wird irrtümlich andauernd signalisiert, dass das Protein noch nicht genug Zeit hatte seine native Konformation einzunehmen.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf danke ich für die Möglichkeit zu dieser Dissertation sowie für seine freundliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Dr. Antje Schäfer danke ich für die vielen anregenden Diskussionen sowie für ihre humorvollen Aufmunterungen und die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dipl.-Chem. Regina Schweizer und Dipl.-Chem Fritz Wartlick für ihre begeisterte Mitarbeit in den Forschungspraktika. Auf diesem Weg wünsche ich ihnen noch viel Erfolg in der Zukunft.

Allen „meinen IBC'ern“ danke ich für die schöne Zeit. In dieser Zeit bin ich durch viele interessante Diskussionen weitergekommen, konnte kollegiale Unterstützung erfahren, habe Freundschaften geschlossen und das Kickerspielen erlernt.

Meiner Mutter Gesine Fischer kann ich gar nicht genug danken! Ich widme ihr diese Arbeit.

Für Zuneigung, Verständnis und Unterstützung danke ich all meinen lieben Freunden und Verwandten.

## Literaturverzeichnis

Anelli, T., and Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *Embo J* 27, 315-327.

Apweiler, R., Hermjakob, H., and Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473, 4-8.

Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Seidman, F.G., Struhl, K., Moore, D.D., Brent, R., and Smith, F.A. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: Greene).

Awasthi, S., Palmer, R., Castro, M., Mobarak, C.D., and Ruby, S.W. (2001). New roles for the Snp1 and Exo84 proteins in yeast pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 276, 31004-31015.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 4, e423.

Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J., and Molinari, M. (2008). A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J Biol Chem* 283, 16446-16454.

Bhamidipati, A., Denic, V., Quan, E.M., and Weissman, J.S. (2005). Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell* 19, 741-751.

Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 15, 2069-2076.

Bischoff, J., and Kornfeld, R. (1986). The soluble form of rat liver alpha-mannosidase is immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane alpha-mannosidase. *J Biol Chem* 261, 4758-4765.

Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.



- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A., and Wolf, D.H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9, 209-222.
- Buck, T.M., Wright, C.M., and Brodsky, J.L. (2007). The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 18, 751-761.
- Buschhorn, B., Kostova, Z., Medicherla, B., and Wolf, D.H. (2004). A genome wide screen identifies Yos9p as a new lectin essential for ER-associated degradation (ERAD) of glycoproteins. *FEBS Lett.* 577, 422-426.
- Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126, 361-373.
- Casagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zuniga, M., Brown, P.O., and Ploegh, H. (2000). Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell* 5, 729-735.
- Chiang, H.L., and Schekman, R. (1991). Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature* 350, 313-318.
- Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 10, 272-282.
- Christianson, T.W., Sikorsky, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-122.
- Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D.M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., and Aebi, M. (2009). Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 184, 159-172.
- 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.
- Denic, V., Quan, E.M., and Weissman, J.S. (2006). A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* 126, 349-359.

- Dwek, R.A. (1996). Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical reviews* 96, 683-720.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., and Johnston, S.A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 7, 981-991.
- 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, 149-191.
- Finger, A., Knop, M., and Wolf, D.H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur J Biochem* 218, 565-574.
- Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., and Lederkremer, G.Z. (2003). Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J Biol Chem* 278, 34119-34124.
- 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.
- Friedmann, E., Salzberg, Y., Weinberger, A., Shaltiel, S., and Gerst, J.E. (2002). YOS9, the putative yeast homolog of a gene amplified in osteosarcomas, is involved in the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi transport of GPI-anchored proteins. *J Biol Chem* 277, 35274-35281.
- Gardner, R.G., and Hampton, R.Y. (1999). A 'distributed degron' allows regulated entry into the ER degradation pathway. *Embo J* 18, 5994-6004.
- 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.
- Gauss, R., Jarosch, E., Sommer, T., and Hirsch, C. (2006a). A complex of Yos9p and the HRD ligase integrates endoplasmic reticulum quality control into the degradation machinery. *Nat Cell Biol* 8, 849-854.

Gauss, R., Sommer, T., and Jarosch, E. (2006b). The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-lumenal substrate selection and Cdc48p recruitment. *Embo J* 25, 1827-1835.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.

Gnann, A., Riordan, J.R., and Wolf, D.H. (2004). Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Degradation Depends on the Lectins Htm1p/EDEM and the Cdc48 Protein Complex in Yeast. *Mol Biol Cell* 15, 4125-4135.

Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524.

Güldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.

Guthrie, C., and Fink, G.R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Vol 194 (San Diego).

Haltiwanger, R.S., and Lowe, J.B. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 73, 491-537.

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, 913-917.

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., and Bhakta, H. (1997). Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12944-12948.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., and Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7, 1153-1163.

Haynes, C.M., Caldwell, S., and Cooper, A.A. (2002). An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p- dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J Cell Biol* 158, 91-102.

Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C., and Wolf, D.H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J* 10, 555-562.

Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.

Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.

Herscovics, A., Romero, P.A., and Tremblay, L.O. (2002). The specificity of the yeast and human class I ER alpha 1,2-mannosidases involved in ER quality control is not as strict previously reported. *Glycobiology* 12, 14G-15G.

Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D.H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.

Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T., and Wolf, D.H. (1993). The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 268, 3479-3486.

Hilt, W., and Wolf, D.H. (2004). The ubiquitin-proteasome system: past, present and future. *Cell Mol Life Sci* 61, 1545.

Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., *et al.* (2006). EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances

glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem* 281, 9650-9658.

Hong, E., Davidson, A.R., and Kaiser, C.A. (1996). A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol* 135, 623-633.

Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., and Nagata, K. (2009). Human OS-9, a lectin required for glycoprotein ERAD, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J Biol Chem*.

Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yoriyuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2, 415-422.

Hosokawa, N., You, Z., Tremblay, L.O., Nagata, K., and Herscovics, A. (2007). Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong alpha1-antitrypsin by Golgi alpha1,2-mannosidases. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 626-632.

Huyer, G., Piluek, W.F., Fansler, Z., Kreft, S.G., Hochstrasser, M., Brodsky, J.L., and Michaelis, S. (2004). Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* 279, 38369-38378.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.

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, 423-430.

Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J., and Aebi, M. (1998). Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 142, 1223-1233.

Jelinek-Kelly, S., and Herscovics, A. (1988). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of the alpha-mannosidase which removes one specific mannose residue from Man9GlcNAc. *J Biol Chem* 263, 14757-14763.

- Jenness, D.D., Li, Y., Tipper, C., and Spatrick, P. (1997). Elimination of defective alpha-factor pheromone receptors. *Mol Cell Biol* *17*, 6236-6245.
- Kaiser, C.A., and Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* *61*, 723-733.
- Kalies, K.U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger, H., and Romisch, K. (2005). The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *Embo J* *24*, 2284-2293.
- Kanehara, K., Kawaguchi, S., and Ng, D.T. (2007). The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 743-750.
- Kim, W., Spear, E.D., and Ng, D.T. (2005). Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* *19*, 753-764.
- Kincaid, M.M., and Cooper, A.A. (2006). Misfolded Proteins Traffic from the ER due to ER Export Signals. *Mol Biol Cell*.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., and Wolf, D.H. (1996a). Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J* *15*, 753-763.
- 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*, 1229-1238.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* *15*, 963-972.
- Kohlmann, S. (2007). Die HECT-Ligase Hul5, eine neue Komponente der ER-assoziierten Proteindegradation. In Institut für Biochemie (Stuttgart, Universität Stuttgart).
- Kohlmann, S., Schafer, A., and Wolf, D.H. (2008). Ubiquitin ligase Hul5 is required for fragment-specific substrate degradation in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* *283*, 16374-16383.

- Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2002). Protein Quality Control in the Export Pathway: The Endoplasmic Reticulum and its Cytoplasmic Proteasome Connection. In Protein Targeting, Transport and Translocation, R.E. Dalbey, and G. von Heijne, eds. (London-New York: Academic Press), pp. 180-213.
- Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* 22, 2309-2317.
- Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2005). Importance of carbohydrate positioning in the recognition of mutated CPY for ER-associated degradation. *J Cell Sci* 118, 1485-1492.
- Kruse, K.B., Brodsky, J.L., and McCracken, A.A. (2006). Autophagy: an ER protein quality control process. *Autophagy* 2, 135-137.
- Lal, A., Pang, P., Kalelkar, S., Romero, P.A., Herscovics, A., and Moremen, K.W. (1998). Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1, 2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases. *Glycobiology* 8, 981-995.
- Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage T4*. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, R.J., Liu, C.W., Harty, C., McCracken, A.A., Latterich, M., Romisch, K., DeMartino, G.N., Thomas, P.J., and Brodsky, J.L. (2004). Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *Embo J* 23, 2206-2215.
- Lehle, L., Strahl, S., and Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie (International ed)* 45, 6802-6818.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Mast, S.W., Diekman, K., Karaveg, K., Davis, A., Sifers, R.N., and Moremen, K.W. (2005). Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology* 15, 421-436.

McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132, 291-298.

Medicherla, B. (2004). A genomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies multiple new gene products essential for protein quality control of the endoplasmic reticulum and degradation: The role of Dsk2p, Rad23p and Yos9p. In Institut fuer Biochemie (Stuttgart, University of Stuttgart).

Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., and Wolf, D.H. (2004). A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* 5, 692-697.

Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., and Paganetti, P. (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299, 1397-1400.

Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (1998). Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 9912-9920.

Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J.F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *Embo J* 11, 2583-2593.

Munro, S. (2001). The MRH domain suggests a shared ancestry for the mannose 6-phosphate receptors and other N-glycan-recognising proteins. *Curr Biol* 11, R499-501.

Nakatsukasa, K., and Brodsky, J.L. (2008). The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 9, 861-870.

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, 8635-8638.

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.



Novick, P., Ferro, S., and Schekman, R. (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-469.

Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.

Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., and Nagata, K. (2003). EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299, 1394-1397.

Olivari, S., Galli, C., Alanen, H., Ruddock, L., and Molinari, M. (2005). A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem* 280, 2424-2428.

Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* 270, 244-253.

Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13, 349-355.

Plemper, R.K., Böhmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.

Plemper, R.K., Bordallo, J., Deak, P.M., Taxis, C., Hitt, R., and Wolf, D.H. (1999a). Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* 112, 4123-4134.

Plemper, R.K., Deak, P.M., Otto, R.T., and Wolf, D.H. (1999b). Re-entering the translocon from the luminal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated carboxypeptidase yscY species. *FEBS Lett* 443, 241-245.

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, 32848-32856.

- Quan, E.M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., and Weissman, J.S. (2008). Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Cell* 32, 870-877.
- Rupp, S., and Wolf, D.H. (1995). Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). The use of active-site mutants of proteinase yscA to determine the necessity of the enzyme for vacuolar proteinase maturation and proteinase yscB stability. *Eur. J. Biochem.* 231, 115-125.
- Rutishauser, J., and Spiess, M. (2002). Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med Wkly* 132, 211-222.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). A Laboratory Manual. In *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sayeed, A., and Ng, D.T. (2005). Search and destroy: ER quality control and ER-associated protein degradation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 75-91.
- Shearer, A.G., and Hampton, R.Y. (2005). Lipid-mediated, reversible misfolding of a sterol-sensing domain protein. *Embo J* 24, 149-159.
- 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.
- Sommer, T., and Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-179.
- Spear, E.D., and Ng, D.T. (2005). Single, context-specific glycans can target misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *J Cell Biol* 169, 73-82.
- Swanson, R., Locher, M., and Hochstrasser, M. (2001). A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* 15, 2660-2674.
- Szathmary, R., Biemann, R., Nita-Lazar, M., Burda, P., and Jakob, C.A. (2005). Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* 19, 765-775.

Taxis, C., Hitt, R., Park, S.H., Deak, P.M., Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* 278, 35903-35913.

Taxis, C., Vogel, F., and Wolf, D.H. (2002). ER-Golgi Traffic Is a Prerequisite for Efficient ER Degradation. *Mol Biol Cell* 13, 1806-1818.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.

Tremblay, L.O., and Herscovics, A. (2000). Characterization of a cDNA encoding a novel human Golgi alpha 1, 2-mannosidase (IC) involved in N-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 275, 31655-31660.

Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3, 246-255.

van Anken, E., and Braakman, I. (2005). Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 191-228.

Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44.

Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130.

Vashist, S., Kim, W., Belden, W.J., Spear, E.D., Barlowe, C., and Ng, D.T. (2001). Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol* 155, 355-368.

Vashist, S., and Ng, D.T. (2004). Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165, 41-52.

Weng, S., and Spiro, R.G. (1993). Demonstration that a kifunensine-resistant alpha-mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells. *J Biol Chem* 268, 25656-25663.

Willer, M., Forte, G.M., and Stirling, C.J. (2008). Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61p using novel derivatives of CPY. *J Biol Chem*.

Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W., and Aoe, T. (2001). The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *Embo J* *20*, 3082-3091.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol* *17*, 279-285.

Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *The FEBS journal* *274*, 630-658.

Zhou, H.J., Liu, Y.K., Chui, J.F., Sun, Q.L., Lu, W.J., Guo, K., Jin, H., Wei, L.M., and Yang, P.Y. (2007). A glycoproteome database of normal human liver tissue. *Journal of cancer research and clinical oncology* *133*, 379-387.

Zuber, C., Cormier, J.H., Guhl, B., Santimaria, R., Hebert, D.N., and Roth, J. (2007). EDEM1 reveals a quality control vesicular transport pathway out of the endoplasmic reticulum not involving the COPII exit sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4407-4412.