

Proteinqualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums: die zentrale Funktion der Ubiquitin-Protein-Ligase Der3/Hrd1p

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

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Peter M. Deak

aus Mainz

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Mitberichter: Priv.-Doz. Dr. Michael Thumm
Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2001

Institut für Biochemie
der Universität Stuttgart
2001



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungen	5
Abstract	7
Zusammenfassung	13
1 Einleitung	14
1.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.1.1 Die Biologie der Hefe.....	14
1.1.2 <i>S. cerevisiae</i> als eukaryoter Modellorganismus	14
1.2 Das sekretorische System.....	15
1.2.1 Der ER-Importprozess.....	16
1.2.2 Proteinfaltung und -Modifikation im ER.....	16
1.2.3 Glykosylierung im ER.....	17
1.3 Zytosolische Proteolyse.....	18
1.3.1 Das Proteasom	19
1.3.2 Das Ubiquitin-System.....	20
1.3.3 Ubiquitin-ähnliche Proteine.....	22
1.4 Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum	23
1.4.1 Das ER-Degradationssystem	23
1.4.2 Substrate der ER-Degradation in Hefe	24
1.4.3 Komponenten und Mechanismus des ERAD-Systems	25
1.4.4 Die „unfolded protein response“	30
1.4.5 Medizinische Relevanz der ER-Degradation	30
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	32
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	34
2.1.3 Plasmide.....	34
2.1.4 Wachstumsmedien.....	36
2.1.5 Antikörper.....	39
2.1.6 Enzyme	39
2.1.7 Primer	40

2.1.8 Kits.....	40
2.1.9 Chemikalien.....	41
2.1.10 Geräte.....	43
2.2 Methoden	44
2.2.1 <i>S. cerevisiae</i> -spezifische Methoden.....	44
2.2.1.1 Hefekulturen	44
2.2.1.2 Transformation von Hefezellen.....	44
2.2.1.3 Genaustausch durch homologe Rekombination	45
2.2.1.4 Carboxypeptidase Y-Aktivitätstest.....	45
2.2.1.5 Isolation von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	46
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	46
2.2.2.1 <i>E. coli</i> -Kulturen	46
2.2.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	47
2.2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	47
2.2.2.4 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	48
2.2.2.5 Restriktionsverdau von DNA	48
2.2.2.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	49
2.2.2.7 Gelextraktion von DNA	50
2.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten	51
2.2.2.11 Sequenzierung von DNA.....	51
2.2.3 Proteinchemische Methoden.....	52
2.2.3.1 Alkalische Lyse von Hefezellen	52
2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.2.3.3 Western-Blot-Analyse.....	54
2.2.3.4 Pulse-Chase-Analyse.....	55
2.2.3.5 Expression von GST-Fusionsproteinen.....	56
2.2.3.6 GST-Interaktionsstudien	57
2.2.3.7 <i>In vitro</i> -Ubiquitylierung von Der3/Hrd1p	58
2.2.3.8 Immunopräzipitation ubiquitylierter CPY*.....	58
2.2.3.9 Deglykosylierung von Der3-Suc2-His4-Fusionsproteinen.....	59
2.2.3.10 Membranextraktion von Proteinen	60
3 Ergebnisse	62
3.1 Die Membrantopologie von Der3/Hrd1p	62
3.1.1 Das ER-Membranprotein Der3/Hrd1p	62
3.1.2 Bestimmung der Orientierung des Carboxyterminus von Der3/Hrd1p.....	63
3.1.3 Bestimmung der Membrantopologie von Der3/Hrd1p.....	65
3.1.4 Bestimmung der Orientierung des Aminoterminus von Der3/Hrd1p	71

✧

3.2 Die Funktion von Der3/Hrd1p als E3-Enzym	72
3.2.1 Der3/Hrd1p-Abhängigkeit der Ubiquitylierung von CPY*	72
3.2.2 Autoubiquitylierung von Der3/Hrd1p	73
3.3 Interaktion von Der3/Hrd1p mit E2-Enzymen	76
3.3.1 Interaktionsstudien mit GST-Der3-Fusionsproteinen	76
3.3.2 Studien mit dem Split-Ubiquitin-System	78
3.4 Interaktionen zwischen Der3/Hrd1p, Hrd3p und Sec61p.....	81
3.4.1 Wechselwirkung zwischen Der3/Hrd1p und Hrd3p.....	81
3.4.2 Wechselwirkung zwischen Der3/Hrd1p bzw. Hrd3p und Sec61p	84
3.5 Beteiligung zytosolischer Chaperone am ERAD-System	87
3.5.1 Die Hsp70-Proteine der Hefe	87
3.5.2 ER-Abbau von CPY* in <i>ssa</i> -Mutanten	89
3.5.3 Die Co-Faktoren der Hsp70-Proteine.....	91
3.5.4 ER-Abbau von CPY* in einer <i>ydj1</i> -Mutante.....	91
3.6 Beteiligung von UbA-Proteinen am ERAD-System	92
3.6.1 Die UbA-Domänen-Proteine Rad23p, Dsk2p und Rpn10p.....	92
3.6.2 ER-Abbau von CPY* in <i>rpn10</i> -, <i>rad23</i> - und <i>dsk2</i> -Mutanten	93
4 Diskussion	95
Literaturverzeichnis.....	101
Danksagung.....	111
Veröffentlichungshinweis.....	112

Abkürzungen

In der nachfolgenden Liste sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Nicht berücksichtigt wurden dabei allgemein gebräuchlichen Abkürzungen sowie chemische Terminologien für Aminosäuren (z.B. Gly, Ala), Kohlenhydrate (z.B. Glc, GlcNAc) und Bezeichnungen für Gene (s.u.).

Symbole für Maßeinheiten wurden nur insofern berücksichtigt, als sie sich nicht unmittelbar vom internationalen System ableiten, das auf den Einheiten Kilogramm (kg), Meter (m), Sekunde (s), Ampère (A), Mol (mol) und Kelvin (K) basiert.

ABC	engl. „ATP binding cassette“
ADP	Adenosin-diphosphat
APC	engl. „anaphase promoting complex“
ATP	Adenosin-triphosphat
ATPase	Adenosin-triphosphatase
bp	Basenpaare
BTPNA	N-Benzoyl- <i>L</i> -tyrosin-p-nitroanilid
°C	Grad Celsius
CPY	Carboxypeptidase yscY
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DAS	engl. „dense alignment surface“
ddH ₂ O	zweifach de-ionisiertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (v. engl. „deoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosid-triphosphat
ddNTP	Di-desoxynucleosid-triphosphat
ECL	engl. „Enhanced Chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
5-FOA	5-Fluoro-orotsäure (v. engl. „5-fluoro-orotic acid“)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HECT	homolog zum E6-AP Carboxyterminus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (v. engl. „horseradish peroxidase“)
IPTG	Isopropyl-β- <i>D</i> -thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1 kg/mol)
M	molar (1 M = 1 mol/l)
MCS	engl. „multi cloning site“
MHC	engl. „major histocompatibility complex“
min	Minute

mM	millimolar (1 mM = 1 mmol/l)
NC	Nitrocellulose
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (v. engl. „open reading frame“)
PBS	engl. „Phosphate buffered saline“
PBST	engl. „Phosphate buffered saline with Tween 20“
PMSF	Phenylmethyl-sulfonylfluorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (v. engl. „polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
PGPH	peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolysierend
RNA	Ribonucleinsäure (v. engl. „ribonucleic acid“)
RNase	Ribonuclease
RING	engl. „really interesting new gene“
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Einheit der Sedimentationskonstante)
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SCF	Skp1p/Cullin/F-Box-Komplex
SDS	Natriumdodecylsulfat (v. engl. „sodium dodecylsulfate“)
SRP	Signalerkennungs-Partikel (v. engl. „signal recognition particle“)
TAE	Tris/Acetat mit EDTA
TBE	Tris/Borat mit EDTA
TBS	engl. „Tris buffered saline“
TE	Tris mit EDTA
TCA	Trichloressigsäure (v. engl. „trichloroacetic acid“)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)amin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Ub	Ubiquitin / Ubiquityl-Rest
UbA	engl. „ubiquitin associated“
UbL	engl. „ubiquitin-like“
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumprozent
w/v	Massenprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
ysc	Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (v. engl. „yeast“)

Terminologie für Hefegene:

Gennamen in *S. cerevisiae* bestehen aus drei Buchstaben und einer Zahl in kursiver Schrift. Wildtyp- bzw. dominante Allele werden in Großbuchstaben dargestellt (z.B. *DER3*), mutierte bzw. rezessive Allele in Kleinbuchstaben (z.B. *der3*). Ggf. wird das Allel durch eine weitere Zahl näher bezeichnet (z.B. *sec61-2*). Die Deletion eines Gens wird durch ein „Δ“ gekennzeichnet, das insertierte Gen folgt hinter zwei Doppelpunkten (z.B. *Δder3::HIS3*). Das durch das Gen kodierte Protein wird durch ein nachgestelltes „p“ symbolisiert (z.B. Der3p), wobei das „p“ bei der Bezeichnung von Fusionsproteinen sowie in Modellen zu Gunsten der Übersichtlichkeit häufig weggelassen wird.



Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is the site of the cell where secretory proteins acquire their native tertiary structure, get posttranslationally modified and from where they are further transported to the Golgi apparatus, the vacuole and the plasma membrane. The process of protein folding and modification in the ER involves not only molecular chaperones, but also the protein glycosylation machinery and catalysts like protein-disulfide isomerases and peptidyl-prolyl isomerases. If a protein is unable to complete these processes successfully, either due to a mutation, a missing binding partner or simply because of accidental misfolding, it is recognized by an effective quality control system and it is retained in the ER, preventing delivery of misfolded proteins to their original destination. Subsequently, these misfolded proteins are transported back into the cytosol, ubiquitylated and degraded by the 26S-proteasome. This process in its entirety is known as ER associated degradation (ERAD).

Among the various substrates of ERAD are both soluble and membrane spanning proteins. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a model organism for the study of eukaryotic cell biology, a mutant form of carboxypeptidase Y (CPY*) is one of the best studied soluble substrates. The pro-form of this vacuolar protease is retained in the ER due to a single point mutation and it is degraded with a half life of about 20 min. Examples for transmembrane proteins that are ERAD substrates are the mutant form of an ABC-transporter of the plasma membrane (Pdr5*) and the native form of HMG-CoA-reductase, which is downregulated upon signals from the mevalonate pathway.

In human cells, ER degradation has several medically relevant implications: degradation of a mutated, but functional form of the CFTR molecule leads to the severe disease of cystic fibrosis; the human cytomegalovirus expresses two proteins which target the host cell's MHC class I heavy chains for degradation, thus preventing its discovery by the immune system. These examples show the importance of understanding the molecular mechanisms of the ERAD machinery.

The first step after the recognition of malformed proteins in the ER is their retrograde transport back into the cytosol. This occurs via the Sec61-translocon, the main protein channel of the ER membrane, which is also responsible for the import of secretory proteins. Membrane spanning proteins are extracted from the membrane by lateral gating of the translocation pore. After retrotranslocation, the substrate proteins are poly-ubiquitylated by repetitive attachment of ubiquitin, a 76 amino acid protein, to the target molecule. A sequence of enzymatic reactions is necessary to link ubiquitin to protein substrates: after activation by a ubiquitin

activating enzyme (E1, Uba1p in yeast) via an ATP requiring step, which leads to the formation of a thiol ester intermediate, ubiquitin is transferred to a cysteine thiol group of an ubiquitin conjugating enzyme (E2). In a third step involving an ubiquitin-protein ligase (E3), ubiquitin is linked via its C-terminus to an ϵ -amino group of the target protein, forming an isopeptide linkage. The polyubiquitin chain is the signal for degradation of the protein by the 26S proteasome.

The E2 enzymes involved in the ubiquitylation of ERAD substrates in yeast are Ubc1p, Ubc6p and Ubc7p, among which deletion of the *UBC7* gene shows the strongest effect in slowing down the degradation of CPY*. In contrast to Ubc1p and Ubc7, which are cytosolic soluble proteins, Ubc6p is a membrane anchored protein. Ubc7p, on the other hand, is recruited to the ER membrane by interaction with the membrane protein Cue1p. Until now, no E3 enzyme acting within the ERAD pathway has been identified yet. However, several new components have been found to play a crucial role in ER degradation, since deletion of the corresponding genes completely abolishes degradation of the substrate proteins. Among these are the ER membrane proteins Der1p, Der3/Hrd1p and Hrd3p, whose functions have so far been unclear.

In this work, the properties of the Der3/Hrd1 protein and its function within the ERAD machinery are investigated. Der3/Hrd1p is a 551 amino acid protein which has been localized to the ER membrane by immuno fluorescence microscopy. It contains a RING-H2-finger domain, a structural motif consisting of 6 cysteine and 2 histidine residues. Recently, a new family of ubiquitin-protein ligases (E3) have been discovered, which all contain a RING-finger domain as a common motif. It has previously been reported that deletion of the RING-H2 domain or exchange of a single cysteine residue at position 399 against serine in the Der3/Hrd1 protein completely abolishes degradation of CPY* and Pdr5*, indicating the essentiality of this domain. It was furthermore shown that Der3/Hrd1p, Hrd3p and Sec61p interact genetically, which led to the proposal that these proteins were both part of the retrotranslocon and of an E3 complex.

To test this hypothesis, it was necessary to determine of the exact membrane topology of Der3/Hrd1p. Sequence analysis of Der3/Hrd1p suggests that the protein contains a hydrophobic amino-terminal region with five or six putative membrane domains and a long hydrophilic carboxy-terminal tail containing the RING-H2 motif. Earlier protease protection experiments had localized the C-terminal RING-H2-finger domain to the lumen of the ER. However, since the ubiquitin conjugating enzyme in charge - Ubc7p - as well as the proteasome reside in the cytoplasm, it was hard to reconcile the fact that the RING-H2

domain of the protein resided in the ER lumen, if Der3/Hrd1p were to function as a ubiquitin-protein ligase. In order to solve this dilemma, I undertook a new set of experiments to localize the C-terminal RING-finger domain of Der3/Hrd1p and to uncover the exact membrane topology of the protein.

First, a new potential N-glycosylation site was introduced between the penultimate and last amino acid of Der3/Hrd1p as previously done with CPY*. This modified Der3/Hrd1p was expressed both in a *DER3* wild type and a Δ *der3* deletion background. In neither case there was a shift of the protein to a higher molecular mass by gel electrophoresis, while CPY* bearing a similar modification was upshifted consistent with the addition of an extra N-glycan. This may indicate that the C-terminus of the Der3/Hrd1 protein does not reach the lumen of the ER where N-glycosylation takes place. However, this experiment does not give a final proof for cytoplasmic localization of the C-terminus of Der3/Hrd1p, since there could be other structural reasons responsible for the absence of glycosylation.

I therefore set up further experiments to prove this result and to finally elucidate the exact membrane topology of Der3/Hrd1p. The hydropathy profile of Der3/Hrd1p predicts five or six transmembrane domains. Chimeric constructs of portions of Der3/Hrd1p fused to His4p and a fragment of invertase (Suc2p) were created and used as topology-sensitive reporters. His4p is the enzyme histidinol-dehydrogenase, which catalyzes the conversion of histidinol to histidine. Yeast *his4* mutant strains expressing a His4 fusion can grow on minimal medium containing histidinol, if the catalytic domain is located on the cytoplasmic side of the ER membrane. In this case, histidinol is metabolized to histidine resulting in a His⁺ phenotype. When the catalytic domain is targeted to the ER lumen, histidinol cannot be converted to histidine, leading to a his⁻ phenotype. On the other hand, when located in the ER lumen, the fusions become extensively glycosylated due to presence of the Suc2 fragment and thus of several N-glycosylation sites. I constructed a series of chimeric proteins consisting of carboxy-terminally truncated versions of Der3/Hrd1p fused to His4p, which allowed me to identify the orientation of each transmembrane domain of Der3/Hrd1p and, in addition, the location of the C-terminal RING-H2-finger domain. Moreover, the invertase sequence contained within these constructs introduced also an epitope for immunodetection, thus making it possible to visualize the fusion proteins using anti-invertase antibodies.

First, using the fusion construct Der3/Hrd1^{Q37}, containing the first potential transmembrane domain, the orientation of the amino terminus of Der3/Hrd1p was determined. This construct does not support growth on histidinol and is heavily glycosylated: Endo H treatment reduces the molecular mass of the fusion protein to its calculated value. These results indicate that the

amino-terminus of Der3/Hrd1^{Q37} resides on the cytoplasmic side of the ER membrane. However, there is still the possibility that the first transmembrane region functions as a cleavable signal sequence or that the entire construct fully translocates into the ER lumen. The latter possibility is ruled out on the basis that Der3/Hrd1^{Q37} is detected in the membrane fraction when anti-invertase antibodies are used. Der3/Hrd1^{Q37} cannot be solubilized with urea, high salt or carbonate. Only after treatment with Triton-X-100, Der3/Hrd1^{Q37} is released into the soluble fraction. Furthermore, it had been previously shown that Der3/Hrd1p interacts genetically with another ER membrane protein necessary for ER degradation, named Hrd3p. Hrd3p spans the membrane once, and its C-terminus is exposed to the cytosol. Thus, it was possible that the N-terminus of Der3/Hrd1p could be in close proximity of the C-terminus of Hrd3p. To elucidate this possibility and to show that the N-terminus of Der3/Hrd1p indeed faces the cytoplasm, I made use of the split-ubiquitin technique. This technique monitors interactions between proteins *in vivo* and is based on the self-reassembly of the N- and C-terminal halves (N_{ub} and C_{ub}) of ubiquitin. The reassembled ubiquitin is recognized by ubiquitin specific proteases which cleave any polypeptide attached to C_{ub} C-terminally. C_{ub} , extended with an N-terminally modified version of the enzyme Ura3p (RUra3p), was linked to the cytosolic C-terminus of Hrd3p. N_{ub} was linked to the N-terminus of Der3/Hrd1p. If C_{ub} and N_{ub} interacted, RUra3p would be cleaved off by the ubiquitin specific proteases. Since the N-terminal residue of RUra3p is an arginine, rapid degradation of RUra3p by the enzymes of the N-end rule pathway would lead to a *ura⁻* phenotype. 5-FOA is converted by Ura3p into 5-fluorouracil, which is toxic for the cells. However, degradation of RUra3p would rescue the cells and would allow growth on medium containing 5-FOA. Cells co-expressing Hrd3- C_{ub} -RUra3 and N_{ub} -Der3/Hrd1 can grow on 5-FOA, indicating interaction, or at least close proximity between the two proteins. This result also implies that the N-terminus of Der3/Hrd1p is cytoplasmic.

Glycosylation scanning with the genetically introduced N-glycosylation site at the C-terminus of Der3/Hrd1p had indicated that this part of the protein does not reach the ER lumen and is, therefore, localized in the cytoplasm. When the construct Der3/Hrd1^{D345}, which contains His4p in the C-terminal region and includes all six potential transmembrane domains, was tested, growth of cells on histidinol and absence of glycosylation was observed. A protein band of the calculated molecular mass was detected upon Western blot analysis. This strongly suggests that the C-terminus of Der3/Hrd1p is located on the cytoplasmic side of the ER, which, once again, indicates that the RING-H2 domain of Der3/Hrd1p is cytoplasmic.

Orientation of the amino- and carboxy-terminus of Der3/Hrd1p to the same side suggests the presence of an even number of transmembrane domains in Der3/Hrd1p.

Therefore, the fusion proteins Der3/Hrd1^{E78}, Der3/Hrd1^{R103}, Der3/Hrd1^{Q134} and Der3/Hrd1^{Q176}, containing the first two, three, four or five putative transmembrane domains, respectively, were analysed. The constructs Der3/Hrd1^{E78} and Der3/Hrd1^{Q134} promoted growth of the cells on histidinol and exhibited a weight comparable to their calculated molecular masses with no additional glycosylation. This indicates a cytoplasmic localization of the His4 domains in both constructs and thus an identical orientation of both transmembrane helices II and IV. In addition, this indicates that the hydrophobic sequence III also constitutes a short helix, which dips into the ER membrane in the opposite direction. In fact, the construct Der3/Hrd1^{R103} didn't promote growth on histidinol and was heavily glycosylated. As expected from such a scenario, the fusion construct Der3/Hrd1^{Q176} did not promote growth on histidinol either and it also was heavily glycosylated, consistent with ER luminal orientation of the His4 portion and the expectation of helix V spanning the ER membrane in opposite direction to transmembrane helices II, IV and VI. From these studies, I predict Der3/Hrd1p to be a protein with six membrane spanning helices, whereby the N- and C-termini of the protein face the cytoplasm.

It had been shown that Der3/Hrd1p is required for the degradation of CPY* and the polytopic membrane protein Pdr5*. Furthermore, the RING-H2 domain was found to be crucial: deletion of the RING-H2 domain or mutation of one of the cysteine residues (C399) within this domain to serine abolished the function of the protein completely. It was thus very likely that Der3/Hrd1p constituted the ubiquitin-protein ligase involved in the degradation of the ER proteins tested so far.

It was analysed whether the RING-H2-finger of Der3/Hrd1p is essential for substrate ubiquitylation. HA-tagged ubiquitin was expressed in cells carrying either *DER3* or *der3C399S* and the corresponding CPY* species were immunoprecipitated with anti-CPY antibodies. In a subsequent Western blot analysis using anti-HA antibodies, ubiquitylated forms of CPY* could be detected in the *DER3* wild type strain. However, the C399S mutation in Der3/Hrd1p abolished ubiquitylation of CPY*.

It is an outstanding feature of ubiquitin-protein ligases to self-ubiquitylate *in vitro* in a RING-finger dependent manner in the absence of other substrate proteins. I tested Der3/Hrd1p for this property. The soluble C-terminal domain of Der3/Hrd1p containing the RING-H2-finger (amino acids 208-551) was expressed as a GST fusion and it was incubated *in vitro* in the presence of ubiquitin, E1 and E2 enzymes and Mg²⁺-ATP. Indeed, the GST-Der3/Hrd1

protein ubiquitylated itself to some extent in an E1 and E2 dependent fashion. As expected, formation of the ubiquitin conjugates was completely abolished in the GST-Der3/Hrd1 species carrying the C399S mutation.

It has been demonstrated that the RING-H2 domain mediates the recruitment of the respective ubiquitin conjugating enzyme (E2) involved in the degradation reaction. In the case of the ubiquitin-protein ligase c-Cbl, it has been shown that the RING-finger motif is essential for binding of the E2 enzyme. In analogy to this, I tested the ability of Der3/Hrd1p to bind the ubiquitin conjugating enzyme Ubc7p, which is known to be necessary for all ubiquitin conjugation reactions that are also dependent on Der3/Hrd1p. The GST fusion described above, containing the RING-H2-finger domain of Der3/Hrd1p, was bound to glutathione Sepharose. Application of extracts of cells expressing a functional myc-tagged Ubc7p to the GST-Der3/Hrd1 sepharose beads resulted in specific binding of Ubc7p to the protein. Interestingly, the inactive mutant Der3/Hrd1-C399S was also defective in binding of Ubc7p. Taken together, the lack of CPY* polyubiquitylation in cells expressing a mutated Der3/Hrd1-C399S protein, the ability to ubiquitylate itself, and its interaction with Ubc7p, clearly identify Der3/Hrd1p as the ubiquitin-protein ligase (E3) of the ER degradation process. The results also show that the RING-H2 domain of the ligase is crucial for the recruitment of the ubiquitin conjugating enzyme Ubc7p and, therefore, for ubiquitylation.



Zusammenfassung

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist diejenige Organelle eukaryoter Zellen, in der sekretorische Proteine ihre native Struktur einnehmen, posttranslatorisch modifiziert werden und ihren Weitertransport in Richtung Golgi-Apparat, Vakuole bzw. Lysosom, Plasmamembran und Extrazellulärraum antreten. Proteine, bei denen die Faltung nicht erfolgreich abgeschlossen werden kann, werden von einem System der Protein-Qualitätskontrolle erkannt, in das Zytosol rücktransportiert und vom Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut.

Studien an dem eukaryoten Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, dass neben dem Sec61-Translokon, dem lumenalen Chaperon Kar2p und den ubiquitin-konjugierenden (E2-) Enzymen Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p am ER-Abbau u.a. die neu identifizierten Membranproteine Der1p, Der3/Hrd1p und Hrd3p beteiligt sind. Der3/Hrd1p fällt durch seine RING-H2-Finger-Domäne auf, einem Sequenzmotiv, dass bei einer Reihe von Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzymen) angetroffen wird.

Um entscheiden zu können, ob Der3/Hrd1p die Rolle eines solchen Enzyms innerhalb des ERAD-Systems übernimmt, wurde die exakte Membran-Topologie des Proteins bestimmt. Es durchspannt die ER-Membran sechs mal und der Carboxyterminus, einschließlich der RING-H2-Domäne, ist zum Zytosol hin orientiert. Es wurde gezeigt, dass Der3/Hrd1p *in vivo* an der Ubiquitylierung des Substrats Carboxypeptidase Y (CPY*) beteiligt ist und sich *in vitro* selbst ubiquityliert, jeweils in Abhängigkeit von einer funktionellen RING-Domäne. Diese Befunde sowie die RING-Finger-abhängige Bindung von Ubc7p an Der3/Hrd1p identifizieren Der3/Hrd1p eindeutig als die am ER-Abbauprozess beteiligte Ubiquitin-Protein-Ligase.

Weiterhin wurden *in vivo*-Interaktionsstudien mit Der3/Hrd1p, Hrd3p und Sec61p durchgeführt, um Aussagen über eine mögliche Komplexbildung dieser Komponenten treffen zu können. Dies führte in den meisten Fällen zu keiner Aussage, da die für die Studien benötigten Fusionsproteine nicht funktionell waren.

Zwischen dem Verlassen des Translokons und ihrem Abbau durch das Proteasom treten die entfalteten Substrate möglicherweise mit Chaperonen oder ähnlichen Proteinen im Zytosol in Wechselwirkung. Eine Beteiligung der Hsp70-Chaperone Ssa1p bis Ssa4p sowie die UbA-Proteine Rpn10p, Rad23p und Dsk2p an der ER-Degradation von CPY* wurde untersucht. Keines dieser Proteine ist für den Abbau erforderlich.



1 Einleitung

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1 Die Biologie der Hefe

Hefen im weitesten Sinne sind einzellige Pilze, die sich durch Zellknospung oder -spaltung vermehren. In der biologischen Systematik bilden sie die Familie der *Saccharomycetaceae*, die in zwei Unterfamilien zerfällt: Die Spalthefen (*Schizosaccharomycetoidae*) vermehren sich durch symmetrische Aufspaltung der Mutterzelle in zwei gleichgroße Tochterzellen, während die Sprosshefen (*Saccharomycetoidae*) Knospen an der Zellwand bilden, die sich abspalten und anschließend zur normalen Größe heranwachsen (Rose und Harrison, 1987).

Unter den Sprosshefen nimmt die Gattung *Saccharomyces* eine herausragende Stellung ein: Als Bier- oder Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) und als Weinhefe (*S. ellipsoides*) wird sie vom Menschen seit Jahrtausenden genutzt. Im ältesten biotechnologischen Verfahren überhaupt, der alkoholischen Gärung, führt sie den anaeroben Abbau von Glucose zu Ethanol und Kohlendioxid durch.

S. cerevisiae kann sich sowohl in Form haploider wie auch diploider Zellen asexuell durch Knospung vermehren. Es gibt aber auch einen sexuellen Fortpflanzungszyklus: Haploide Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp, **a** bzw. α , können zu einer diploiden Zelle, einer Zygote, verschmelzen. Diploide Zellen sporulieren bei limitierenden Nährstoffbedingungen und bilden einen Ascus mit vier Sporen. Aus diesen entstehen unter günstigeren Bedingungen wiederum vier haploide Zelllinien, jeweils zwei vom Paarungstyp **a** und α .

Neben der oben erwähnten alkoholischen Gärung kann die Hefe, bei ausreichender Sauerstoff-Zufuhr, die Glucose auch vollständig zu Kohlendioxid oxidieren (aerober Stoffwechsel). In Medien mit ausreichend hoher Glucosekonzentration steigt die Zahl der Zellen zunächst exponentiell an (sog. logarithmische Phase). Wird die Kohlenstoffquelle limitierend, treten die Zellen in die stationäre Phase ein, in der keine weitere Vermehrung erfolgt (Rose und Harrison, 1987).

1.1.2 *S. cerevisiae* als eukaryoter Modellorganismus

Trotz ihrer relativen Einfachheit ist die Hefe als Modell für eukaryote Zellen von nicht zu unterschätzendem Wert. Grundlegende zelluläre Vorgänge wie Genregulation, Protein-

synthese und -Abbau und Sekretion, um nur einige zu nennen, sind von der Hefe bis hin zu Säugerzellen in hohem Maße konserviert. Bei der Untersuchung dieser Prozesse bietet die Hefe eine ganze Reihe von Vorteilen:

Hefezellen können auf festen Nährböden (Agarplatten) oder in Flüssigkulturen relativ einfach kultiviert werden, und die Verdopplungszeit von ca. 90 min ermöglicht die Anzucht größerer Zellmengen eines Stammes in kurzer Zeit. Das DNA-Rekombinationssystem der Hefe bietet vielfältige Möglichkeiten zur Manipulation ihres Genoms mit, im Vergleich zu Säugerzellen, sehr einfachen Mitteln (Guthrie und Fink, 1991). Plasmide können in Hefezellen unter Selektionsdruck stabil gehalten werden. Zur Selektion werden meist auxotrophe Marker verwendet. Um dies zu ermöglichen, tragen die im Labor verwendeten Wildtyp-Stämme Mutationen in einigen Genen, die die Biosynthese von Aminosäuren oder Nukleinbasen betreffen (Guthrie und Fink, 1991).

Das Genom der Hefe ist mit ca. 14 Millionen bp relativ klein (das Genom des Menschen enthält ca. 3 Milliarden bp). Seit 1997 ist die Sequenz des Hefegenoms vollständig bekannt und im Internet frei zugänglich (Goffeau *et al.*, 1997), was das molekularbiologische Arbeiten erheblich vereinfacht. *S. cerevisiae* verfügt über ca. 5800 Gene bzw. offene Leserahmen (ORFs) auf 16 Chromosomen, von denen in etwa die Hälfte „bekannt“ sind, d.h. dass den von ihnen kodierten Proteinen biochemische Eigenschaften und Funktion zugeordnet werden können (Goffeau *et al.*, 1997).

Die Bezeichnung von Proteinen in den nachfolgenden Abschnitten bezieht sich, soweit nicht anders angegeben, auf die Hefe *S. cerevisiae*.

1.2 Das sekretorische System

Der Sekretionsweg für Proteine in eukaryoten Zellen beginnt mit dem Import in das endoplasmatische Retikulum (ER) und führt von hier mittels vesikulärem Transport über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment zum Golgi-Apparat, der sich aus cis-, medial- und trans-Golgi zusammensetzt. Vom Golgi-Apparat aus gelangen die Proteine über Transportvesikel zum prävakuolären Kompartiment und schließlich zur Vakuole (in tierischen Zellen Lysosom), zur Plasma-Membran oder in das extrazelluläre Milieu (Rapoport *et al.*, 1996).



1.2.1 Der ER-Importprozess

Proteine können co- oder posttranslatorisch in das ER gelangen. Bei der cotranslatorischen Translokation verläuft der Transport synchron mit der Synthese des Proteins am Ribosom, die posttranslatorische Translokation setzt erst nach Abschluss der Proteinsynthese ein (Corsi und Schekman, 1996).

Die Translokation wird dadurch initiiert, dass eine hydrophobe aminoterminal Signalsequenz des sekretorischen Proteins an einen RNA-Proteinkomplex (das SRP, „signal recognition particle“) bindet, welcher das naszierende Polypeptid zum Importkanal, dem Sec61-Komplex, dirigiert. Die Kernkomponente dieses Komplexes ist ein Heterotrimer aus den Proteinen Sec61p, Sbh1 und Sss1p; für die posttranslatorische Translokation sind zusätzlich die Membranproteine Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p erforderlich (Johnson und van Waes, 1999). Die Signal- oder Präsequenz wird in die ER-Membran integriert und nach Abschluss der Translokation durch die Signalpeptidase (Sec11p) abgespalten (von Heijne, 1998). Die Triebkraft für den Import liefert auf der zytosolischen Seite das Ribosom durch die Hydrolyse von GTP sowie im ER-Lumen das Chaperon Kar2p (in Säugerzellen BiP, „binding protein“), das unter ATP-Hydrolyse an das translozierte Polypeptid bindet (Corsi und Schekman, 1996). Die hydrophoben Bereiche von Transmembranproteinen verlassen den Kanal während der Translokation lateral und werden so in die ER-Membran eingebettet (Mothes *et al.*, 1997).

1.2.2 Proteinfaltung und -Modifikation im ER

Sekretorische Proteine erreichen das ER-Lumen in Form entfalteter Polypeptidketten, die sofort mit Chaperonen in Wechselwirkung treten. Zu den wichtigsten Chaperonen des ER gehört das bereits oben erwähnte Kar2p, das über seine DnaK-Domäne mit den DnaJ-Domänen der Co-Chaperone Sec63p, Scj1p und Jem1p interagiert (Corsi und Schekman, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1995). Das Chaperon bleibt so lange mit dem Protein assoziiert, bis dieses seine native Faltung eingenommen hat, und erfüllt somit eine essentielle Aufgabe: die Verhinderung „falscher“, unspezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen und der Aggregation von Proteinen. Das Chaperon bindet unter ATP-Hydrolyse in wiederholten Zyklen an hydrophobe Bereiche des ungefalteten Proteins, wobei die Spaltung des ATP durch das interagierende Co-Chaperon stimuliert wird (Pilon und Schekman, 1999). Ein weiteres Chaperon des ER, das wie Kar2p zur Hsp70-Familie gehört, ist das Protein Lhs1p, das aber im Gegensatz zu Kar2p nicht essentiell ist (Tyson und Stirling, 2000).

Neben der Faltung und ggf. Assoziation zu Proteinkomplexen unterliegen die meisten Proteine im ER aber auch chemischen Modifikationen, die durch Enzyme katalysiert werden: Begünstigt durch das oxidative Milieu im ER-Lumen, werden Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Cysteinresten der Polypeptidkette gebildet (Tu *et al.*, 2000). Die hierfür verantwortlichen Enzyme sind die Protein-Disulfid-Isomerasen, in Hefe in erster Linie die Enzyme Pdi1p (Freedman *et al.*, 1994) und Eug1p (Tachibana und Stevens, 1992). Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, u.a. Cpr4p, katalysieren die cis/trans-Isomerisierung von Prolinen innerhalb der Aminosäurekette (Klappa *et al.*, 1995).

1.2.3 Glykosylierung im ER

Die konzertiert mit der Translokation ablaufende Glykosylierung ist ein wichtiges Merkmal eukaryotischer sekretorischer Proteine. Bei der N-Glykosylierung wird durch das Enzym Oligosaccharyltransferase ein Oligosaccharid der Struktur $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ auf den freien Stickstoff des Asparaginrests in der Erkennungssequenz Asn-X-Ser bzw. Asn-X-Thr übertragen (Helenius und Aebi, 2001). Voraussetzung hierfür ist, dass das entsprechende Asparagin eine Länge von etwa 12-14 Aminosäuren vom Translokation entfernt ist und in Bezug auf die evtl. bereits ausgebildete Sekundärstruktur des Proteins frei zugänglich ist (Nilsson und von Heijne, 1993). Anschließend wird das Oligosaccharid durch die Glucosidasen I und II sowie durch α -Mannosidase I prozessiert (vgl. Abbildung 1-1).

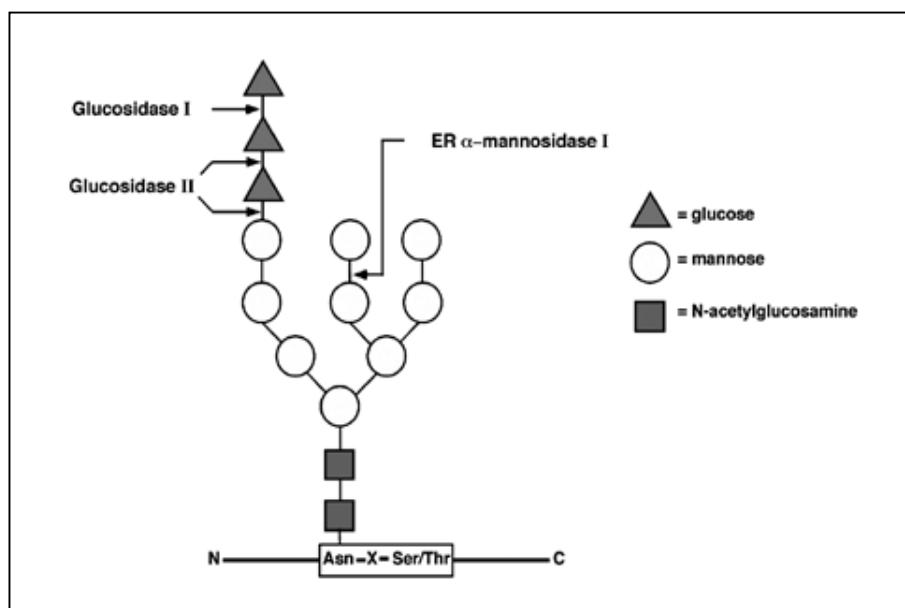


Abb. 1-1: Struktur und Modifikation der Oligosaccharide im ER (aus Helenius und Aebi, 2001).



Nur Proteine, die sowohl ihre native Faltung als auch ein korrektes Glykosylierungsmuster aufweisen, können das ER in Richtung Golgi verlassen (Ellgaard *et al.*, 1999; Helenius und Aebi, 2001).

Um dies sicherzustellen, treten die modifizierten Kohlenhydratketten im ER mit Lectinen in Wechselwirkung, die die Proteine im faltungskompetenten Milieu des ER zurückhalten und somit ähnlich wie die Chaperone eine Art Zeitfenster für das Erreichen der Tertiärstruktur zur Verfügung stellen (Andersson *et al.*, 1996). In Hefe übernimmt neben Calnexin (Cne1p) möglicherweise auch das vor kurzem identifizierte Protein Htm1/Mnl1p Lectin-Funktionen. Es weist zwar Homologie zur α -Mannosidase I auf, ist jedoch nicht an der Modifizierung der Oligosaccharide beteiligt (Jakob *et al.*, 2001).

Die korrekte Glykosylierung von Proteinen ist ein wesentlicher Faktor in der Protein-Qualitätskontrolle des ER (vgl. Abschnitt 1.4).

1.3 Zytoplasmatische Proteolyse

Der klassische und bereits seit längerer Zeit bekannte Schauplatz zellulärer Proteolyse ist die Vakuole bzw. das Lysosom. In diesem zum sekretorischen System gehörenden Kompartiment werden Proteine durch verschiedene Proteinasen und Peptidasen gespalten und abgebaut (Knop *et al.*, 1993). Zu den wichtigsten Proteasen gehören u.a. die Proteinase A (Pep4p), die Proteinase B (Prb1p) und die Carboxypeptidase Y (CPY/Prc1p) (Van Den Hazel *et al.*, 1996). Der Hauptzweck vakuolärer Proteolyse besteht in der Rückgewinnung von Aminosäuren bzw. der Energiegewinnung unter Hungerbedingungen. Der Transport der Substratproteine zur Vakuole erfolgt über die Autophagozytose: In diesem hungerinduzierten Prozess wird zytosolisches Material unspezifisch in doppelwandige Vesikel eingeschlossen, die anschließend mit der vakuolären Membran fusionieren (Thumm, 2000; Klionsky und Emr, 2000).

Proteolyse spielt aber auch eine entscheidende Rolle in der zellulären Regulation: Neben Transkriptionskontrolle und Proteinmodifikation ist sie ein wichtiges Instrument zur schnellen und spezifischen Inaktivierung von Proteinen als Antwort auf veränderte Bedingungen oder zur Steuerung zellulärer Prozesse wie Mitose und Meiose (Heinemeyer *et al.*, 1991). Diese hochspezifische Proteolyse wird durch das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System ausgeführt.

1.3.1 Das Proteasom

Das Proteasom ist ein multimerer Protease-Komplex im Zytosol und im Zellkern aller eukaryoter Zellen. Es besteht aus einem zylindrischen Kernpartikel, dem 20S-Proteasom mit einem Molekulargewicht von ca. 700 kDa, das zusammen mit zwei regulatorischen 19S-Partikeln das 26S-Proteasom mit einem Molekulargewicht von ca. 1700 kDa bildet (Coux *et al.*, 1996; Hilt und Wolf, 1996; Hilt und Wolf, 1995). Die Bezeichnungen 19S, 20S und 26S beziehen sich auf die Sedimentationskonstanten der einzelnen Partikel in Svedberg-Einheiten. Das 20S-Proteasom besteht aus vier Ringen mit je sieben Untereinheiten, die gestaffelt übereinander gelagert sind. Die beiden äußeren Ringe werden jeweils aus sieben verschiedenen α -Untereinheiten, die inneren Ringe aus sieben verschiedenen β -Untereinheiten gebildet (Groll *et al.*, 1997). Alle Untereinheiten sind für das Überleben der Hefe essentiell, d.h. keine Untereinheit kann eine andere ersetzen. Diese Tatsache macht die enorme Komplexität des eukaryotischen Proteasoms gegenüber seinem archebakteriellen Vorläufer, dem Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum*, deutlich: Dieses ist aus je sieben identischen α - bzw. β -Untereinheiten aufgebaut (Löwe *et al.*, 1995).

Die katalytische Aktivität des Proteasoms wird lediglich durch die drei β -Untereinheiten Pup1p, Pre2p und Pre3p ausgeübt (Heinemeyer *et al.*, 1997). Gemäß ihrer Substratspezifität werden diese proteolytischen Aktivitäten als trypsin-ähnliche (Pup1p), chymotrypsin-ähnliche (Pre2p) und peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolysierende (PGPH, Pre3p) Aktivität bezeichnet (Gerards *et al.*, 1998; Groll *et al.*, 1999). Die katalytischen Zentren befinden sich im Inneren des Zylinders, dessen Öffnungen an beiden Seiten auf Grund ihres Durchmessers nur entfaltete Polypeptide aufnehmen können (Groll *et al.*, 1997). Das 20S-Proteasom spaltet *in vitro* nicht gefaltete Polypeptidketten in einem ATP-unabhängigen Prozess unter Bildung von Peptiden mit einer durchschnittlichen Länge von 8 bis 10 Aminosäuren (Baumeister *et al.*, 1998; Heinemeyer *et al.*, 1997).

Die *in vivo*-Substrate des Proteasoms sind jedoch gefaltete Proteine, die als Markierung für den Abbau ubiquityliert sind (Pickart, 2000) (vgl. Abschnitt 1.3.2). Die Aufgabe der Erkennung, Bindung und Entfaltung dieser Substrate übernehmen die an beiden Seiten des Kernpartikels assoziierten regulatorischen 19S-Komplexe (Glickman *et al.*, 1998; DeMartino *et al.*, 1994). Das 19S-Partikel besteht aus 18 Untereinheiten, von denen sechs ATPasen sind (Rpt1p bis Rpt6p). Diese bilden einen Ring über der Öffnung des 19S-Partikels und vermitteln über ATP-Hydrolyse die Triebkraft für die Entfaltung des Substrates und seine Translokation in das Kernpartikel (Seeger *et al.*, 1997; Hoffman und Rechsteiner, 1994). Die

übrigen zwölf Untereinheiten, Rpn1p bis Rpn12p, sind sehr unterschiedlicher Natur und zeigen wenig Homologien zu anderen Proteinen (Glickman *et al.*, 1998). Rpn10p interagiert *in vitro* mit Polyubiquitin-Ketten; da es jedoch im Gegensatz zu allen anderen Untereinheiten nicht essentiell ist, kann es zumindest nicht der einzige Ubiquitin-Rezeptor des 19S-Partikels sein (van Nocker *et al.*, 1996).

Eine Reihe weiterer Proteine co-fraktionieren in verschiedenen Aufreinigungsmethoden mit dem Proteasom, darunter einige Chaperone, was eine Beteiligung weiterer Komponenten an der Substrat-Entfaltung wahrscheinlich macht (Verma *et al.*, 2000). Das Protein Ubr1p, ein E3-Enzym, aber auch mehrere E2-Enzyme, interagieren *in vitro* mit verschiedenen Untereinheiten des 19S-Partikels (Xie und Varshavsky, 2000; Tongaonkar *et al.*, 2000) (vgl. Abschnitt 1.3.2). Dies könnte beim Transport der Substrate zum Proteasom eine Rolle spielen.

1.3.2 Das Ubiquitin-System

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, das in sämtlichen Eukaryoten hoch konserviert ist (Hochstrasser, 1996). Es wird mittels seinem aminoterminalen Glycinrest unter Ausbildung einer Isopeptidbindung an ϵ -Aminogruppen von Lysinen des Substratproteins oder an dessen Aminoterminus kovalent gebunden (Breitschopf *et al.*, 1998). Weitere Ubiquityl-Reste werden in gleicher Weise an den Lysinrest 48 des jeweils vorhergehenden Ubiquitins gebunden. Diese Polyubiquitylierung stellt das Signal für den Abbau des Proteins durch das 26S-Proteasom dar (Pickart, 2000). Das einzige bislang bekannte Protein, das ohne Ubiquitylierung vom Proteasom abgebaut wird, ist die Ornithin-Decarboxylase (Murakami *et al.*, 1996).

Die Bildung der Polyubiquitin-Kette erfolgt in einer Enzymkaskade unter Beteiligung der Enzyme E1, E2 und E3 (Hershko und Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996; Ciechanover, 1998):

Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, in Hefe Uba1p, aktiviert das Ubiquitin unter ATP-Verbrauch und bindet es über eine Thioester-Bindung an einen Cysteinrest (McGrath *et al.*, 1991). Das E1 überträgt den Ubiquityl-Rest auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 (Ubc1p bis Ubc8p, Ubc10, Ubc11p und Ubc13p), das wiederum einen Thioester mit Ubiquitin ausbildet (Jentsch *et al.*, 1990). Vom E2-Enzym wird das Ubiquitin entweder direkt auf das Substrat übertragen, wobei ein E3-Enzym eine vermittelnde Rolle spielt, oder es erfolgt auch zwischen dem E3 und Ubiquitin eine intermediäre kovalente Bindung. In beiden Fällen kommt dem E3, der Ubiquitin-Protein-Ligase, die Schlüsselrolle in dem gesamten

Prozess zu, da sie für die Substraterkennung und somit die hohe Spezifität des Systems verantwortlich ist (Hershko und Ciechanover, 1998). Die Homologie der E3s untereinander ist nicht sehr hoch, und viele E3-Enzyme sind für eines oder wenige Substrate spezifisch. Wie bereits angedeutet, lassen sich zwei Gruppen von Ubiquitin-Protein-Ligasen unterscheiden:

Die HECT-E3-Enzyme enthalten eine zum Carboxyterminus des humanen E6-AP Proteins homologe Sequenz. E6-AP ist das am Abbau des Tumorsuppressors p53 beteiligte E3 (Scheffner *et al.*, 1990). HECT-E3s, in Hefe u.a. Rsp5p, Tom1p und Ufd4p, bilden direkte Thioester-Bindungen mit Ubiquitin und übertragen dieses anschließend auf ihr Substrat (Smith *et al.*, 1996).

Die wesentlich zahlreichere Klasse der RING-E3-Enzyme zeichnet sich durch einen sogenannte RING-Finger aus, einer Domäne mit sechs Cysteinen und zwei Histidinen (RING-H2) bzw. sieben Cysteinen und einem Histidin (RING-HC). Von diesen Aminosäureresten werden zwei Zink-Ionen komplexiert (Jackson *et al.*, 2000) (vgl. Abbildung 1-2).

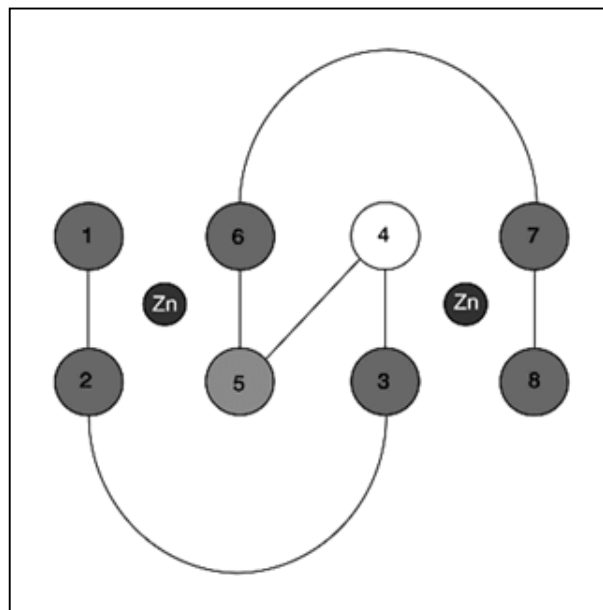


Abb. 1-2: Die räumliche Struktur der RING-Finger-Domäne. Der Aminosäurerest 5 ist ein Histidin in RING-H2-Motiven und ein Cystein in RING-HC-Motiven. Der Rest 4 ist ein Histidin, die übrigen Reste sind Cysteine (aus Jackson *et al.*, 2000).

Der RING-Finger wurde erstmals 1993 als ein dem Zink-Finger verwandtes Sequenzmotiv beschrieben und steht für „really interesting new gene“ (Freemont, 1993). Seitdem wurden allein in Hefe fast 40 Proteine mit einer RING-Domäne identifiziert, und obwohl es sich bei vielen davon um E3-Enzyme handelt, lässt sich nicht definitiv sagen, ob jedes RING-Finger-Protein ein E3 ist, da der Wirkungsmechanismus dieses Motivs noch weitgehend unklar ist.

RING-E3s bilden kein Thioester-Intermediat mit Ubiquitin, sondern vermitteln indirekt die Ubiquitylierung des Substrats durch das E2 (Joazeiro und Weissman, 2000; Jackson *et al.*,

2000). Dies erfordert Spezifität und Affinität sowohl gegenüber dem Substratprotein als auch dem entsprechenden E2. Neben eigenständigen, monomeren RING-E3s, wie z.B. Ubr1p in Hefe, gibt es verschiedene multimere E3-Komplexe, die jeweils eine RING-Finger-Untereinheit enthalten (Tyers und Willems, 1999). Hierzu zählen der SCF-Komplex („Skp1p/Cullin/F-Box“) mit dem RING-Finger-Protein Hrt1p (Deshaies, 1999) sowie der APC („anaphase promoting complex“) mit dem RING-Finger-Protein Apc11p, der eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt (Zachariae und Nasmyth, 1999). Die Integrität des RING-Fingers ist essentiell für die biologische Aktivität der RING-E3-Enzyme, für ihre Fähigkeit zur Autoubiquitylierung *in vitro* und in vielen Fällen auch für eine Wechselwirkung mit dem entsprechenden E2-Enzym (Joazeiro und Hunter, 2000; Jackson *et al.*, 2000). So konnte z.B. eine direkte Interaktion zwischen Ubr1p und Ubc2p (Xie und Varshavsky, 1999) sowie zwischen dem humanen E3 c-Cbl und UbcH7 (Zheng *et al.*, 2000) bzw. den humanen E3 AO7 und UbcH5 (Lorick *et al.*, 1999) nachgewiesen werden. Dass der RING-Finger auch die für die Ubiquitylierung entscheidende Komponente im APC ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass für die Bildung von Polyubiquitinketten *in vitro* die Komponenten Apc11p, Ubc4p und Uba1p ausreichend sind (Gmachl *et al.*, 2000).

1.3.3 Ubiquitin-ähnliche Proteine

Neben Ubiquitin gibt es weitere Proteine ähnlicher Größe, in Hefe v.a. Smt3p und Rub1p, die an Lysinreste von Substratproteinen gebunden werden können und eine ca. 50%-ige Homologie zu Ubiquitin aufweisen. Im Gegensatz zur Ubiquitylierung ist diese Markierung jedoch kein Abbausignal, und es wird jeweils nur ein Molekül auf das Substrat übertragen (Hochstrasser, 2000; Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Der Zweck dieser Modifizierung ist der Schutz potentieller Substratproteine vor Ubiquitylierung oder die Regulation der Aktivität von Enzymen (Furukawa *et al.*, 2000; Lammer *et al.*, 1998). Insbesondere bestimmte E3-Enzyme werden mit Smt3p modifiziert, um sie vor Selbstubiquitylierung zu schützen und ihre Aktivität gegenüber dem Substrat zu erhöhen. Entfernung des Smt3p-Restes führt dann zum Abbau des E3-Enzyms und somit zur Stabilisierung des Substrates. Ein Beispiel hierfür ist das humane E3 Mdm2 (Melchior und Hengst, 2000).

Einige andere Ubiquitin-ähnliche Proteine sind zwar wesentlich größer als Ubiquitin selbst, besitzen jedoch am Aminoterminus eine starke Homologie zu Ubiquitin (UbL-Domäne) und im carboxyterminalen Bereich eine sog. UbA-Domäne (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Während die UbL-Domäne mit dem Proteasom interagiert, vermag die UbA-Domäne an

Polyubiquitinketten zu binden, was vermuten lässt, dass diese Proteine am Transport von Substraten zum Proteasom beteiligt sind (vgl. Abschnitt 3.6). In Hefe sind dies zum einen Rad23p, das eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt (Schauber *et al.*, 1998), sowie Dsk2p. Eine UbA-Domäne besitzt auch die nicht-essentielle proteasomale Untereinheit Rpn10p (vgl. Abschnitt 1.3.1).

1.4 Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum

Bei der enormen Menge an sekretorischen Proteinen, die permanent ins Lumen des ER transloziert werden und die dort ihre native Konformation einnehmen müssen, fällt unweigerlich ein gewisser Anteil an „Ausschuss“ an: Proteine, die ihre korrekte Faltung nicht oder nur teilweise einnehmen, sei es auf Grund von Mutationen, fehlenden Interaktionspartnern oder schlicht der Tatsache, dass der komplexe Faltungsvorgang von Proteinen in der Regel keine 100%-ige Ausbeute erreichen kann.

Damit solche missgefalteten Proteine nicht weitertransportiert werden, existiert im ER ein System der Protein-Qualitätskontrolle, an dem Chaperone, Lectine und Enzyme wie z.B. die Proteindisulfid-Isomerase beteiligt sind (Ellgaard *et al.*, 1999). Nachdem die Proteine im ER zurückgehalten wurden, müssen sie schließlich dem Abbau zugeführt werden.

1.4.1 Das ER-Degradationssystem

Der proteolytische Abbau ER-residenter Proteine wird als ER-Degradation oder ERAD (ER assoziierte Degradation) bezeichnet (Plemper und Wolf, 1999; Brodsky und McCracken, 1999). Entgegen früherer Annahmen erfolgt dieser Abbau nicht durch Proteasen im ER selbst, sondern durch das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System (Wiertz *et al.*, 1996b; Hiller *et al.*, 1996).

Zu den Substraten der ER-Degradation gehören neben den oben beschriebenen Substraten der Qualitätskontrolle auch funktionsfähige Proteine, die auf bestimmte Signale hin abgebaut werden (vgl. Abschnitt 1.4.2). In beiden Fällen müssen die Proteine zunächst ins Zytosol gelangen, um dort ubiquityliert und durch das Proteasom abgebaut werden zu können. Dieser Rücktransport (Retrotranslokation) erfolgt über den Importkanal, den Sec61-Komplex, an den in diesem Fall möglicherweise noch weitere Komponenten unter Ausbildung eines „Retrotranslokons“ assoziiert sind (Plemper *et al.*, 1997). Zumindest das am posttrans-

latorischen Import beteiligte Sec63p wird auch für den Export von Proteinen aus dem ER benötigt (vgl. Abschnitt 1.4.3).

1.4.2 Substrate der ER-Degradation in Hefe

Zu den am besten untersuchten ERAD-Substraten in *S. cerevisiae* gehört die als CPY* bezeichnete mutierte Form der Carboxypeptidase yscY (Finger *et al.*, 1993). Wildtyp-CPY (Prc1p) wird als Präpro-Form mit 61 kDa synthetisiert und gelangt posttranslatorisch in das ER, wo sie nach Abspaltung der Präsequenz und N-Glykosylierung an vier Asparaginen als Pro-Form mit 67 kDa vorliegt. Nach dem Weitertransport über den Golgi-Apparat zur Vakuole wird dort die Prosequenz durch die Proteinase A abgespalten, was zur reifen CPY mit einem Molekulargewicht von 61 kDa führt (Van Den Hazel *et al.*, 1996).

CPY* kann auf Grund eines Glycin-zu-Arginin-Austausches an Position 255 (Allel *prc1-1*) seine native Tertiärstruktur nicht mehr einnehmen, wird am Weitertransport zum Golgi gehindert und mit einer Halbwertszeit von 20 min über die ER-Degradation abgebaut (Hiller *et al.*, 1996). Auf gleiche Weise erfolgt der Abbau einer mutierten, missgefalteten Form der Proteinase A (PrA*). Ein weiteres Beispiel für ein lösliches ERAD-Substrat ist die nichtglykosylierte Präpro-Form des Pheromons α -Faktor, für die im Gegensatz zu den meisten anderen Substraten jedoch bisher keine Ubiquitylierung nachgewiesen werden konnte (Werner *et al.*, 1996; McCracken und Brodsky, 1996).

Aber auch zahlreiche integrale Membranproteine können, wenn mutiert oder nicht zum Komplex assembliert, aus der ER-Membran entfernt und degradiert werden. Beispiele hierfür sind die Proteine Pdr5p, Yor1p, Sec61p, Vph1p, Fur4p und Ste6p.

Pdr5p ist ein ABC-Transporter in der Plasmamembran, der für den Export zytotoxischer Verbindungen zuständig ist (Bissinger und Kuchler, 1994). Die mutierte Form Pdr5*, mit einem Cystein-zu-Tyrosin-Austausch an Position 1427 (Allel *pdr5-26*), wird in der ER-Membran zurückgehalten und abgebaut (Plemper *et al.*, 1998). Bei den ABC-Transportern Yor1p und Ycf1p führt die Deletion eines Phenylalanin-Restes zum Abbau. Dieselbe Deletion ist auch für die Instabilität des humanen CFTR-Proteins verantwortlich (Katzmann *et al.*, 1999) (vgl. Abschnitt 1.4.5).

Die HMG-CoA-Reduktase, Hmg2p, ist ein Beispiel für ein natives ER-Membranprotein, das der regulierten Proteolyse unterliegt (Hampton und Bhakta, 1997). Der Abbau dieses Enzyms wird durch Rückkopplungs-Signale aus dem Mevalonat-Stoffwechselweg induziert bzw. blockiert (Gardner und Hampton, 1999). Interessanterweise kann das stabile Isoenzym



Hmg1p durch Mutation ebenfalls zum ERAD-Substrat werden, was darauf schließen lässt, dass sich die Mechanismen zur Erkennung regulierter und missgefalteter Substrate ähnlicher Signale bedienen (Wilhovsky *et al.*, 2000).

Eine Sonderrolle nimmt das Protein Sec61p ein, das einerseits die Kernkomponente des Transportkanals bildet und zum Anderen, in der mutierten Form Sec61-2p, selbst ein Substrat des ERAD-Systems ist (Biederer *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997).

Zellen, die das *sec61-2* Allel tragen, sind temperatursensitiv oberhalb von 37 °C, da ab dieser Temperatur die Affinität von Sec61-2p gegenüber seinen Komplexpartnern zu gering ist, um eine ausreichende Anzahl stabiler Translokons zu bilden (Stirling *et al.*, 1992). Auch bei niedrigeren Temperaturen ist die Komplexbildung weniger effektiv als im Wildtyp, einmal gebildete Translokons sind jedoch funktionell und am Abbau von nicht-assemblierten Sec61-2p Molekülen beteiligt. Da die Anzahl der Translokons jedoch reduziert ist, kann die ER-Degradation nur verlangsamt ablaufen. So wird z.B. CPY* bei 25 °C mit einer um den Faktor drei verringerten Rate abgebaut (Plemper *et al.*, 1997).

1.4.3 Komponenten und Mechanismus des ERAD-Systems

Der erste Schritt beim Abbau missgefalteter Proteine besteht in der Erkennung der Substrate, wobei der genaue Mechanismus dieser Erkennung noch weitgehend unklar ist. Ausschlaggebend ist hier vermutlich ein komplexes Zusammenspiel der Chaperone, Lectine und Faltungsenzyme wie Pdi1p und Eug1p mit ihren jeweiligen Substraten (Ellgaard *et al.*, 1999). Das essentielle Chaperon Kar2p ist, ebenso wie seine Interaktionspartner Sec63p, Scj1p und Jem1p, am Abbau der meisten löslichen ERAD-Substrate beteiligt. Die Halbwertszeit von CPY* ist in Zellen mit den mutierten Allelen *kar2-113* oder *sec63-1* in etwa verdoppelt (Plemper *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass für den Export zwar die Translokon-Komponente Sec63p, nicht aber Sec62p benötigt wird, macht deutlich, dass die genaue Zusammensetzung des Transportkanals für Import bzw. Export unterschiedlich sein muss und das Retrotranslokon evtl. noch weitere, spezifische Faktoren enthält (s.u.).

Für das Chaperon Lhs1p, das für die Zelle nicht essentiell ist, konnte bisher keine Beteiligung am ERAD-System nachgewiesen werden (R. Plemper, persönliche Mitteilung).

Kar2p bleibt mit der Polypeptidkette so lange assoziiert, bis diese ihre native Faltung einnimmt. Ist dies nicht möglich, muss eine Dirigierung zurück zum Kanal erfolgen, was durch die Wechselwirkung zwischen Kar2p und Sec63p möglicherweise begünstigt wird (Lyman und Schekman, 1995).



Denkbar wäre auch ein Modell, in dem das missgefaltete Protein den Importkanal nie vollständig verlässt. Dies kann jedoch durch die Tatsache ausgeschlossen werden, dass eine zusätzliche eingefügte N-Glykosylierungssequenz am Carboxyterminus von CPY* im ER tatsächlich erkannt und glykosyliert wird, was nur bei einem entsprechenden Abstand von der Membran möglich ist (vgl. Abschnitt 1.2.3). Lösliche ERAD-Substrate verlassen das Translokon also vollständig und müssen zu ihm zurückgeleitet werden (Plempner *et al.*, 1999b).

Für die Membranextraktion und den Abbau von Transmembranproteinen ist Kar2p hingegen nicht notwendig (Plempner *et al.*, 1998). Für Pdr5* sowie für einige Substrate in Säugerzellen wurde eine Beteiligung des Sec61-Komplexes gezeigt, was auf eine laterale Öffnung des Kanals hindeutet, also eine Umkehrung des bei der Membraninsertion ablaufenden Prozesses (Plempner *et al.*, 1998; Wiertz *et al.*, 1996b).

Wie bereits angedeutet, ist auch die N-Glykosylierung und deren „Kontrolle“ durch Lectine ein bedeutender Faktor bei der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen. Durch die Anheftung und Modifizierung der Oligosaccharide, die in wiederholten Zyklen abläuft, wird die Proteinfaltung begünstigt und ein zeitlicher Rahmen für die Faltung definiert (Jakob *et al.*, 1998). Eine CPY*, deren Mannose-9-Rest nicht mehr abgespalten werden kann, weil die α -Mannosidase I des ER fehlt, ist in ihrer Degradation stark beeinträchtigt. Auch eine CPY*-Form, deren Akzeptorsequenzen für die Glykosylierung entfernt wurden, wird trotz ihrer Missfaltung nicht abgebaut und akkumuliert im ER, da sie vom Qualitätskontrollsystem offensichtlich nicht erkannt wird (Knop *et al.*, 1996b).

Das Lectin Cne1p (Calnexin), das an die Oligosaccharide von Glykoproteinen bindet, ist für die Degradation von CPY* zwar nicht erforderlich, wohl aber für den Abbau von Präpro- α -Faktor (McCracken und Brodsky, 1996). Die Deletion des *HTM1/MNLI*-Gens, das für ein Mannosidase-homologes Protein kodiert, führt jedoch zur Stabilisierung von sowohl CPY* als auch dem glykosylierten Membranprotein Pdr5*. Dies lässt vermuten, dass Htm1/Mnl1p, das selber keine Mannosidase-Aktivität besitzt, an Mannose-Reste bindet und ebenfalls die Funktion eines Lectins übernimmt (Jakob *et al.*, 2001).

Auch die Protein-Disulfid-Isomerasen des ER übernehmen Qualitätskontroll-Funktionen. Sie knüpfen und lösen wiederholt Cystein-Brücken und wirken dabei ähnlich wie Chaperone, die statt von ATP von einem Redoxpotential angetrieben werden (Tsai *et al.*, 2001). Mutationen in dem essentiellen Protein Pdi1p verlangsamten sowohl den Abbau von CPY* als auch von Präpro- α -Faktor. Das nicht-essentielle Homolog Eug1p wird für die Degradation von CPY* hingegen nicht benötigt (Gillece *et al.*, 1999).

Nach der Erkennung und Retrotranslokation werden die Substrate ubiquityliert und vom 26S-Proteasom abgebaut. Einige Mutationen in β -Untereinheiten des Kernpartikels (*pre1*, *pre2*, *pre4*) oder in ATPasen der regulatorischen Untereinheit (*rpt1*, *rpt6*) führen zu einer deutlichen Stabilisierung von CPY* (Hiller *et al.*, 1996).

Die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme, die an diesem Prozess beteiligt sind, sind Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p (Hiller *et al.*, 1996; Friedlander *et al.*, 2000). Dabei kommt Ubc7p offensichtlich die größte Bedeutung zu, da in Δ *ubc7* Zellen der stärkste Effekt zu beobachten ist. In Δ *ubc1* Δ *ubc7* Doppelmutanten ist der Abbau von CPY* vollständig blockiert (Friedlander *et al.*, 2000). Ubc1p und Ubc7p sind lösliche Proteine, während Ubc6p durch seinen Aminoterminus in der ER-Membran verankert ist (Sommer und Jentsch, 1993). Ubc7p wird durch Interaktion mit Cue1p, das ebenfalls einen Membrananker besitzt, an die ER-Membran lokalisiert. Die Aufhebung dieser Lokalisation durch die Deletion von *CUE1* führt zur Stabilisierung von CPY* (Biederer *et al.*, 1997).

Retrograder Transport und proteasomaler Abbau sind ein konzertierter Vorgang. Wird der zytosolische Ubiquitylierungs- und Abbaumechanismus inaktiviert, findet auch kein Export der Substratmoleküle aus dem ER mehr statt. Eine Akkumulation des Substrats oder eines proteolytischen Fragments im Zytosol konnte bisher nicht beobachtet werden (Plemper und Wolf, 1999). Dies gilt insbesondere auch für Transmembranproteine: weder beim Abbau von Pdr5* noch von Hmg2p treten Zwischenprodukte auf, was darauf hindeutet, dass die Proteine unter Beteiligung des Sec61-Kanals aus der Membran extrahiert, ubiquityliert und abgebaut werden (Plemper *et al.*, 1997; Hampton und Bhakta, 1997). Frühere Modelle, nach denen zunächst zytosolische Bereiche degradiert werden, würden das Auftreten von Intermediaten erwarten lassen und konnten somit bisher nicht bestätigt werden (Sommer und Wolf, 1997).

Neben den bisher beschriebenen Proteinen, die am ER-Degradationsweg beteiligt sind, wurden noch weitere Komponenten identifiziert, deren genaue Funktion aber größtenteils noch nicht aufgeklärt ist.

Bei der Suche nach weiteren Mutanten, die im Abbau von CPY* blockiert sind, wurden die Gene *DER1* und *DER3* gefunden. Eine ähnliche Suche nach Mutanten, die Hmg2p nicht mehr abbauen, führte zu den Genen *HRD1* und *HRD3* (Hampton *et al.*, 1996). Die Gene *DER3* und *HRD1* erwiesen sich als identisch.

Der1p ist ein stark hydrophobes Protein, das in der ER-Membran lokalisiert ist. In Δ *der1* Zellen ist der Abbau von CPY* und PrA* vollständig blockiert, für alle anderen bisher untersuchten Substrate wird Der1p allerdings nicht benötigt (Knop *et al.*, 1996a).



Der3/Hrd1p ist ebenfalls ein ER-Membranprotein und besitzt eine RING-H2-Finger-Domäne (Bordallo *et al.*, 1998). Die Deletion des Gens, aber auch eine Punktmutation in der RING-Domäne, führen zur vollständigen Stabilisierung von CPY*, Hmg2p und einigen anderen ERAD-Substraten (Bordallo und Wolf, 1999; Wilhovsky *et al.*, 2000) (vgl. Abschnitt 3.1).

Hrd3p ist zum größten Teil im Lumen des ER lokalisiert und über eine carboxyterminale Domäne in der Membran verankert. Es ist glykosyliert und wie Der3/Hrd1p an der Degradation einer Reihe von Substraten beteiligt, darunter CPY* und Hmg2p (Wilhovsky *et al.*, 2000; Plemper *et al.*, 1999a).

Die Funktion der Proteine Der3/Hrd1p und Hrd3p im ERAD-System scheint eng gekoppelt zu sein. In $\Delta hrd3$ Zellen wird das normalerweise äußerst stabile Der3/Hrd1p rasch abgebaut, und zwar mit einer Halbwertszeit von ca. 7 min wesentlich schneller als normale ERAD-Substrate (Plemper *et al.*, 1999a). Der Abbau ist abhängig vom Ubiquitin-Proteasom-Weg: während die Deletion von *UBC6* keinen Effekt zeigt, ist Der3/Hrd1p in $\Delta hrd3 \Delta ubc7$ Zellen wieder völlig stabil. In $\Delta hrd3 sec61-2$ Doppelmutanten wird Der3/Hrd1p ebenfalls vollständig stabilisiert, was in auffälligem Gegensatz zur nur dreifachen Stabilisierung von CPY* in *sec61-2* Zellen steht (Plemper *et al.*, 1999a). Diese enge genetische Interaktion von Der3/Hrd1p und Hrd3p untereinander sowie mit Sec61p lassen Spekulationen zu, dass die Proteine Der3/Hrd1p und/oder Hrd3p möglicherweise am Aufbau des Retrotranslokons beteiligt sind (vgl. Abschnitt 3.4).

Die bisher bekannten Komponenten des ER-Degradationssystems und deren Zusammenspiel sind in dem Modell in Abbildung 1-3 dargestellt.

Im Zusammenhang mit dem retrograden Transport durch den Sec61-Kanal stellt sich auch die Frage nach der Triebkraft. Neben lumenalen Chaperonen, die nur für lösliche Substrate benötigt werden, müssen auch auf zytosolischer Seite ATP-getriebene Systeme beteiligt sein (Johnson und Haigh, 2000). Die rasche Ubiquitylierung des Substrats nach dem Verlassen des Kanals, die im ersten, durch das E1 katalysierten Schritt, ATP-abhängig ist, verhindert durch die Größe der Polyubiquitinkette ein Zurückgleiten des Polypeptids (Biederer *et al.*, 1997).

Auch die ATPasen des 19S-Partikels des Proteasoms könnten Energie zur Retrotranslokation beitragen (Mayer *et al.*, 1998). Obwohl ein beträchtlicher Anteil der 26S-Proteasomen in Hefe im Bereich des ER lokalisiert sind (Enenkel *et al.*, 1998), konnte bislang keine Komponente identifiziert werden, die eine direkte Assoziation des Proteasoms an die ER-Membran vermitteln könnte. Der Substrattransport zum Proteasom könnte jedoch auch weitere Faktoren wie die UbL/UbA-Domänen-Proteine erfordern (vgl. Abschnitte 1.3.3 und 3.6).

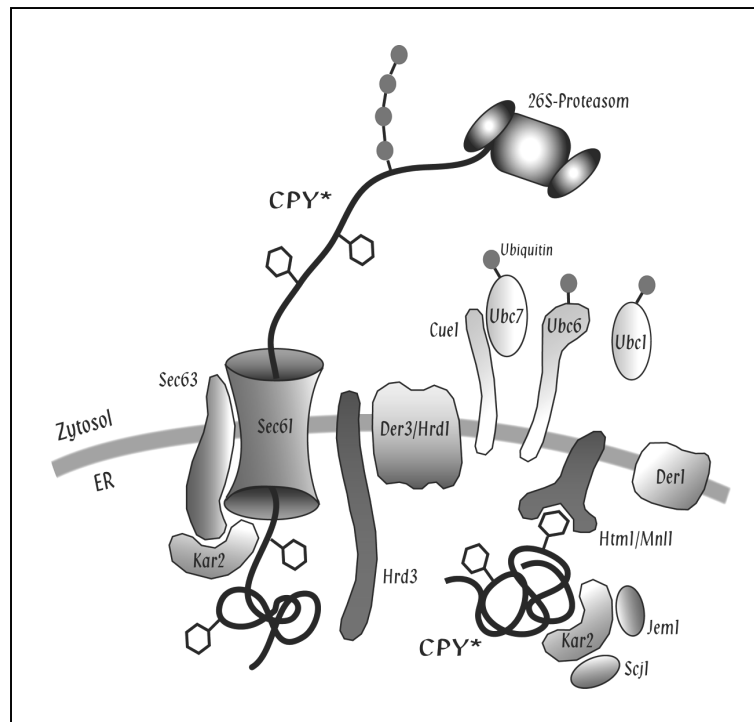


Abb. 1-3: Das ERAD-System am Beispiel des löslichen Substratmoleküls CPY*

Da die Substrate den Kanal als entfaltete Polypeptide verlassen, wäre eine Interaktion mit zytosolischen Chaperonen denkbar, um sie vor Aggregation oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu schützen. In Säugerzellen wurde eine Beteiligung des zytosolischen Chaperons Hsp90 bei der Degradation eines mutierten Insulin-Rezeptors nachgewiesen (Imamura *et al.*, 1998). Auch der Abbau des CFTR-Moleküls (vgl. Abschnitt 1.4.5) ist von den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 abhängig, für die im Komplex mit dem Co-Faktor CHIP sogar eine Rolle als E3 postuliert wird (McClellan und Frydman, 2001; Meacham *et al.*, 2001). Obwohl in Hefe bisher kein Homolog zu CHIP gefunden wurde, ist eine Beteiligung von Hsp70 oder Hsp90 nicht auszuschließen (vgl. Abschnitt 3.5).



1.4.4 Die „unfolded protein response“

Da die Erkennung und Eliminierung missgefalteter Proteine für die Zelle einen enorm wichtigen Prozess darstellt, ist es zunächst verwunderlich, dass die Deletion von Genen wie *DER1*, *DER3/HRD1*, *HRD3*, *UBC6*, *UBC7* oder *CUE1*, die für das ERAD-System essentiell sind, auf das Wachstumsverhalten der Zellen praktisch keinen Einfluss hat (Plempner und Wolf, 1999).

Unter der „unfolded protein response“ (UPR) versteht man die Antwort der Zelle auf eine erhöhte Konzentration von ungefalteten Proteinen im Lumen des ER. Dies kann bedingt sein durch eine vermehrte Produktion fehlerhafter Proteine, durch die Inhibition der Glykosylierung durch Agenzien wie Tunicamycin oder durch die Änderung des Redoxpotentials des ER durch Reduktionsmittel wie Dithiothreit (Pahl, 1999). Das ER-Transmembranprotein Ire1p wird unter normalen Bedingungen durch Interaktion mit Kar2p an der Dimerisierung gehindert. Die vermehrte Bildung ungefalteter Proteine senkt die Konzentration an „freiem“ Kar2p, woraufhin Ire1p dimerisiert und auf der zytosolischen Seite der ER-Membran das Spleißen von *HAC1*-mRNA katalysiert (Sidrauski und Walter, 1997). Das daraufhin synthetisierte Protein Hac1p dient als Aktivator für die Expression zahlreicher Proteine, die für die UPR benötigt werden, darunter Chaperone und Faltungsenzyme des ER, Translokon-Untereinheiten sowie sämtliche oben erwähnten Komponenten des ER-Degradationssystems (Travers *et al.*, 2000).

In der Tat sind die UPR und das ERAD-System eng gekoppelt. So sind z.B. *Δire1 Δder3/hrd1* Doppelmutanten temperatursensitiv und zeigen erhöhte Sensitivität gegen Tunicamycin, was auf Zellen mit jeweils nur einer Deletion nicht zutrifft (Friedlander *et al.*, 2000). Die Zelle muss entweder über ein funktionierendes Abbausystem verfügen, um ungefaltete Proteine zu beseitigen, oder über die Möglichkeit, durch eine Überexpression von Chaperonen diese Proteine zu binden. Letzterer Fall tritt auch dann ein, wenn das ERAD-System in seiner Funktion beeinträchtigt ist (Friedlander *et al.*, 2000; Hampton, 2000).

1.4.5 Medizinische Relevanz der ER-Degradation

Zahlreiche ERAD-Substrate beim Menschen stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit der Entstehung schwerer Krankheiten sowie der Wirkungsweise von Viren.

Mukoviszidose (Zystische Fibrose) ist eine schwere Erbkrankheit, die zu bronchopulmonalen Störungen und intestinaler Maldigestion führt. In 90% aller Fälle ist für ihr Auftreten eine

Mutation im CFTR-Protein, dem „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“, einem Chlorid-Kanal in der Plasmamembran der Epithelzellen, verantwortlich (Collins, 1992). Während selbst das Wildtyp-Protein zu über 70% der ER-Degradation unterliegt, wird CFTR Δ F508, dem ein Phenylalanin an Position 508 fehlt, vollständig abgebaut, obwohl es in der Plasmamembran funktionell wäre (Bebök *et al.*, 1998). Das ERAD-System wird hier offensichtlich durch bestimmte Sequenzmuster fehlgeleitet: der Austausch von vier Argininen zu Lysin bewirkt die vollständige Stabilisierung von CFTR Δ F508 und seinen Transport zur Plasmamembran (Chang *et al.*, 1999).

Auch bei der Entstehung der neurodegenerativen Parkinson'schen Krankheit spielt die Degradation eines ER-Membranproteins eine Rolle. Bei den meisten Patienten führen Mutationen im Protein „Parkin“ zum Ausbruch der Krankheit (Kitada *et al.*, 1998). Parkin ist ein E3-Enzym, das u.a. den Abbau des membrangebundenen Pael-Rezeptor induziert. Ist Parkin nicht funktionell, können nicht-abgebaute Pael-Rezeptoren aggregieren und zum Zelltod von Neuronen führen (Imai *et al.*, 2001). Auch verschiedene missgefaltete Formen des Prion-Proteins PrP, das u.a. für die Creutzfeld-Jakob-Krankheit verantwortlich ist, werden unter normalen Umständen vom ERAD-System abgebaut (Hegde *et al.*, 1998).

Viren können das ER-Degradationssystem nutzen, um ihrer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen (Ploegh, 1998). Zum Schutz vor Viren werden im ER Fragmente viraler Proteine an MHC Klasse I („major histocompatibility complex“) Moleküle gebunden. Diese gelangen über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche und werden dort präsentiert, woraufhin die betroffene Zelle von CD8⁺-T-Lymphozyten als infiziert erkannt und zerstört wird. Das humane Zytomegalie-Virus umgeht diesen Mechanismus, indem zwei der von ihm kodierten Proteine, US2 und US11, mit den MHC-Molekülen interagieren. Diese werden dadurch vom ERAD-System als Substrat „erkannt“, durch den Sec61-Komplex exportiert und proteasomal abgebaut (Shamu *et al.*, 1999; Wiertz *et al.*, 1996a). Einer ähnlichen Strategie bedient sich das HIV-Virus, indem es mit seinem Protein Vpu den Abbau des Rezeptors CD4 induziert (Margottin *et al.*, 1998).

Auch toxische Proteine missbrauchen den retrograden Transportweg, um ins Zytosol ihrer Wirtszelle zu gelangen und dort ihre Wirkung zu entfalten. Sowohl die bakteriellen Zellgifte Cholera-Toxin und Shiga-Toxin als auch das pflanzliche Ricin gelangen über Endozytose in die Zelle und über retrograden Vesikeltransport in das ER (Falnes und Sandvig, 2000). Von dort aus können sie über bislang wenig aufgeklärte Mechanismen ihren eigenen Transport durch das Sec61-Translokon in das Zytosol induzieren (Simpson *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Sämtliche Hefestämme, die für diese Arbeit verwendet wurden, sowie daraus hergestellte neue Stämme, sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Genauere Angaben zu den Eigenschaften bzw. zur Herstellung der jeweiligen Stämme befinden sich in Abschnitt 3.

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit eingesetzte *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle / Referenz
W303-1B	<i>MATα ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 trp1-1</i>	Chiang und Schekman, 1991
W303-1C	W303-1B <i>prc1-1</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996a
YJB009	W303-1B <i>prc1-1 Δder3::HIS3</i>	Bordallo <i>et al.</i> , 1998
ACY17b	W303-1B <i>Δydj1-2::HIS3 Δleu2::ydj1-151</i>	Caplan <i>et al.</i> , 1992a
YPD5	W303-1B <i>Δydj1-2::HIS3 Δleu2::ydj1-151 prc1-1</i>	diese Arbeit
JN55	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 lys2</i>	Becker <i>et al.</i> , 1996
JN516	JN55 <i>Δssa2::LEU2 Δssa3::TRP1 Δssa4::LYS2</i>	Becker <i>et al.</i> , 1996
a1-45 Δ U	JN55 <i>ssa1-45 Δssa2::LEU2 Δssa3::TRP1 Δssa4::LYS2</i>	Becker <i>et al.</i> , 1996
YPD20	JN55 <i>prc1-1</i>	diese Arbeit
YPD21	JN55 <i>Δssa2::LEU2 Δssa3::TRP1 Δssa4::LYS2 prc1-1</i>	diese Arbeit
YPD22	JN55 <i>ssa1-45 Δssa2::LEU2 Δssa3::TRP1 Δssa4::LYS2 prc1-1</i>	diese Arbeit
STY50	<i>MATα HOL1-1 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 his4-401 Δsuc2::LEU2</i>	Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999
JD53	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-200 lys2-80 trp1-63</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999
NJY61-I	JD53 <i>NUI-SEC61::pRS304</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999
NJY61-A	JD53 <i>NUA-SEC61::pRS304</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999
NJY61-G	JD53 <i>NUG-SEC61::pRS304</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 2-1 (Forts.)

NJY78-I	JD53 <i>NUI-SSH1::pRS304</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999
NJY78-A	JD53 <i>NUA-SSH1::pRS304</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999
NJY78-G	JD53 <i>NUG-SSH1::pRS304</i>	Wittke <i>et al.</i> , 1999
YPD41	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i>	diese Arbeit
YPD42	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i>	diese Arbeit
YPD60	W303-1B <i>prc1-1 HRD3^D-CUB-R-URA3::pRS305</i>	diese Arbeit
YPD61	W303-1B <i>prc1-1 HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i>	diese Arbeit
YPD48	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUI-SEC61::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD49	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUA-SEC61::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD50	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUG-SEC61::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD51	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUI-SSH1::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD52	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUA-SSH1::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD53	JD53 <i>HRD3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUG-SSH1::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD54	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUI-SEC61::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD55	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUA-SEC61::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD56	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUG-SEC61::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD57	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUI-SSH1::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD58	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUA-SSH1::pRS304</i>	diese Arbeit
YPD59	JD53 <i>DER3-CUB-R-URA3::pRS305</i> <i>NUG-SSH1::pRS304</i>	diese Arbeit
BY4743	<i>MATa/MATa MET15/Δmet15 LYS2/Δlys2</i> <i>Δura3/Δura3 Δleu2/Δleu2 his3-1/his3-1</i>	Euroscarf, Frankfurt a. M.
BYΔrpn10	BY4743 <i>Δrpn10</i>	Euroscarf, Frankfurt a. M.
BYΔrad23	BY4743 <i>Δrad23</i>	Euroscarf, Frankfurt a. M.
BYΔdsk2	BY4743 <i>Δdsk2</i>	Euroscarf, Frankfurt a. M.

2.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit eingesetzte *E. coli*-Stämme.

Stamm	Eigenschaft / Verwendung	Quelle / Referenz
DH5 α	DNase-defizienter Stamm für die Amplifikation und Sicherung von Plasmiden	Hanahan, 1983
BL21	Protease-defizienter Stamm für die Expression von GST-Fusionsproteinen	Amersham, Little Chalfont, GB

2.1.3 Plasmide

Wenn möglich, wurden Shuttle-Vektoren der „pRS“-Serie verwendet (Sikorski und Hieter, 1989). Diese enthalten für die Replikation in *E. coli* das Ampicillin-Resistenzgen (*Amp^R*) und eine *ori*-Sequenz („origin of replication“). Für die Selektion in *S. cerevisiae* tragen die Vektoren eines von vier verschiedenen Markergenen und ggf. eine *CEN6/ARSH4* oder 2μ -Replikationssequenz. Die Bezeichnung der Plasmide kodiert wie folgt deren Eigenschaften:

pRS XYZ	X = 3 oder 4	Orientierung der MCS („multi cloning site“)
	Y = 0	integratives Plasmid ohne Hefe-Replikationssequenz
	1	centromerisches Plasmid (eine Kopie pro Zelle)
	2	2μ -Plasmid (mehrere Kopien pro Zelle)
	Z = 3	<i>HIS3</i> -Marker
	4	<i>TRP1</i> -Marker
	5	<i>LEU2</i> -Marker
	6	<i>URA3</i> -Marker

Stellvertretend ist in Abbildung 2-1 die Plasmidkarte des Plasmids pRS313 abgebildet.

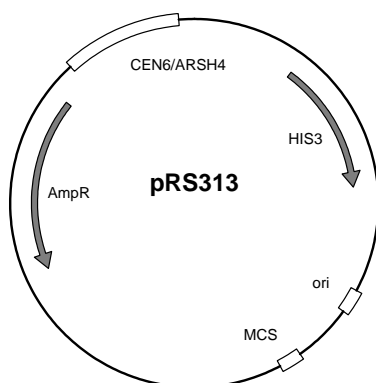


Abb. 2-1: Der Shuttle-Vektor pRS313 mit der centromerischen Replikationssequenz *CEN6/ARSH4* und dem Hefe-Markergen *HIS3*.

Eine Liste aller weiteren verwendeten bzw. hergestellten Plasmide mit einer Kurzbeschreibung findet sich in Tabelle 2-3. In Abschnitt 3 wird die Herstellung und Verwendung der einzelnen Plasmide ausführlich beschrieben.

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide.

Name	Beschreibung	Quelle / Referenz
bMK150	<i>prc1-1</i> Allel mit nativem Promotor in pRS306	Knop <i>et al.</i> , 1996a
pRS313- <i>prc1-G5</i>	<i>prc1-G5</i> Allel mit nativem Promotor in pRS313	Plemper <i>et al.</i> , 1999b
pCT40	<i>prc1-1HA₃</i> Allel mit nativem Promotor in pRS316	C. Taxis, Stuttgart
YEp <i>DER3</i>	<i>DER3</i> Allel mit nativem Promotor in YEp366	Bordallo <i>et al.</i> , 1998
pRS426- <i>der3CS</i>	<i>der3-C399S</i> Allel mit nativem Promotor in pRS426	Bordallo <i>et al.</i> , 1998
YEp <i>DER3-G</i>	<i>DER3-G</i> Allel mit nativem Promotor in YEp366	diese Arbeit
pRS315- <i>DER3</i>	<i>DER3</i> Allel mit nativem Promotor in pRS315	diese Arbeit
YEp112	Expressionsplasmid für HA-Ub unter der Kontrolle des <i>CUP1</i> -Promotors	Hochstrasser <i>et al.</i> , 1991
YEp352	2 μ -Shuttle-Vektor mit <i>URA3</i> -Marker	Hill <i>et al.</i> , 1986
pR90	<i>PMT1^{R90}-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999
pQ37	<i>DER3^{Q37}-PMT1-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	diese Arbeit
pE78	<i>DER3^{E78}-PMT1-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	diese Arbeit
pR103	<i>DER3^{R103}-PMT1-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	diese Arbeit
pQ134	<i>DER3^{Q134}-PMT1-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	diese Arbeit
pQ176	<i>DER3^{Q176}-PMT1-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	diese Arbeit
pD345	<i>DER3^{D345}-PMT1-SUC2-HIS4</i> -Fusion in YEp352	diese Arbeit
pGEX-4T-1	Plasmid zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen und deren Expression in <i>E. coli</i>	Amersham, Little Chalfont, GB
pGEX- <i>DER3</i>	Expressionsplasmid für GST-Der3	diese Arbeit
pGEX- <i>der3CS</i>	Expressionsplasmid für GST-Der3-C399S	diese Arbeit
pTX146	<i>myc-UBC7</i> Allel mit nativem Promotor in pRS416	Biederer <i>et al.</i> , 1997
pTX31	<i>ubc6TM</i> Allel mit nativem Promotor in pSEY8	Sommer und Jentsch, 1993
pSEC63- <i>CUB</i>	<i>SEC63-CUB-R-URA3</i> Konstrukt in pRS305	Wittke <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 2-3 (Forts.)

pHRD3-CUB	HRD3-CUB-R-URA3 Konstrukt in pRS305	diese Arbeit
pHRD3 ^D -CUB	HRD3 ^D -CUB-R-URA3 Konstrukt in pRS305	diese Arbeit
pDER3-CUB	DER3-CUB-R-URA3 Konstrukt in pRS305	diese Arbeit
pNUx-SED5	NUI-, NUA- bzw. NUG-SED5 im Vektor pRS314	Wittke <i>et al.</i> , 1999
pNUx-SEC22	NUI-, NUA- bzw. NUG-SEC22 im Vektor pRS314	Wittke <i>et al.</i> , 1999
pNUx-SEC62	NUI-, NUA- bzw. NUG-SEC62 im Vektor pRS314	Wittke <i>et al.</i> , 1999
pNUx-UBC6	NUI-, NUA- bzw. NUG-UBC6 im Vektor pRS314	N. Johnsson, Köln
pNUx-DER3	NUI-, NUA- bzw. NUG-DER3 im Vektor pRS314	diese Arbeit
pNUx-UBC7	NUI-, NUA- bzw. NUG-UBC7 im Vektor pRS314	diese Arbeit

2.1.4 Wachstumsmedien

Für Medien und Lösungen wurde ausschließlich zweifach de-ionisiertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Wachstumsmedien wurden zur Sterilisation für 25 min bei 120 °C autoklaviert. Feste Medien (Agarplatten) enthielten jeweils zusätzlich zu den angegebenen Komponenten 2% *Bacto*[®] Agar (alle Prozentangaben in diesem Abschnitt beziehen sich auf w/v).

YPD-Medium, pH 5,5:

Vollmedium für Hefe-Kulturen mit folgenden Komponenten:

- 1% Hefeextrakt
- 2% *Bacto*[®] Pepton
- 2% D-Glucose

CM-Medium, pH 5,6:

Synthetisches Selektionsmedium für Hefe-Kulturen mit folgenden Komponenten:

- 0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids
- 2% D-Glucose
- 0,0117% L-Alanin
- 0,0117% L-Arginin
- 0,0117% L-Asparagin
- 0,0117% L-Asparaginsäure
- 0,0117% L-Cystein
- 0,0117% L-Glutamin
- 0,0117% L-Glutaminsäure
- 0,0117% L-Glycin
- 0,0117% L-Isoleucin

0,0117% *L*-Methionin
0,0117% *L*-Phenylalanin
0,0117% *L*-Prolin
0,0117% *L*-Serin
0,0117% *L*-Threonin
0,0117% *L*-Tyrosin
0,0117% *L*-Valin
0,0117% myo-Inosit
0,00117% p-Aminobenzoensäure

Von den nachfolgenden Supplementen fehlt jeweils das zu selektionierende:

0,3 mM *L*-Histidin
1,7 mM *L*-Leucin
1 mM *L*-Lysin
0,4 mM *L*-Tryptophan
0,3 mM Adenin
0,2 mM Uracil

MV-Medium, pH 5,5:

Synthetisches Minimalmedium für Hefe-Kulturen mit folgenden Komponenten:

0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids
2% *D*-Glucose
0,3 mM *L*-Histidin
1,7 mM *L*-Leucin
1 mM *L*-Lysin
0,4 mM *L*-Tryptophan
0,3 mM Adenin
0,2 mM Uracil

Für 5-FOA-Medium (zur Gegenselektion auf *URA3*) zusätzlich:

1 mg/ml 5-Fluoro-orotsäure
0,4 mM Uracil

Für Histidinol-Medium ohne *L*-Histidin, statt dessen zusätzlich:

6 mM *L*-Histidinol

Labelling-Medium, pH 6,0:

Methioninfreies Medium für die Pulse-Chase-Analyse mit folgenden Komponenten:

0,17% Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate
0,1% *D*-Glucose
0,04% *L*-Serin
0,02% *L*-Threonin
0,015% *L*-Valin
0,01% *L*-Asparaginsäure
0,01% *L*-Glutaminsäure
0,005% *L*-Phenylalanin
0,003% *L*-Arginin

0,003% *L*-Tyrosin

Von den nachfolgenden Supplementen fehlt jeweils das zu selektionierende:

0,3 mM *L*-Histidin

1,7 mM *L*-Leucin

1 mM *L*-Lysin

0,4 mM *L*-Tryptophan

0,3 mM Adenin

0,2 mM Uracil

Chase-Medium, pH 6,0:

Medium für die Pulse-Chase-Analyse, enthält neben den Komponenten des Labelling-Mediums zusätzlich:

0,6% *L*-Methionin

0,2% Rinderserumalbumin

LB-Medium, pH 7,5:

Medium für Bakterien-Kulturen des *E. coli*-Stammes DH5 α mit folgenden Komponenten:

1% *Bacto*[®] Trypton

0,5% Hefeextrakt

0,5% Natriumchlorid

Für LB_{amp}-Medium (zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz) zusätzlich:

75 μ g/ml Ampicillin

SOC-Medium, pH 7,4:

Medium für Bakterien-Kulturen nach der Elektroporation mit folgenden Komponenten:

2% *Bacto*[®] Trypton

0,5% Hefeextrakt

0,4% *D*-Glucose

10 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Magnesiumsulfat

2,5 mM Kaliumchlorid

2*YTA-Medium, pH 7,0:

Medium für Bakterien-Kulturen des *E. coli*-Stammes BL21 mit folgenden Komponenten:

1,6% *Bacto*[®] Trypton

1% Hefeextrakt

0,5% Natriumchlorid

100 μ g/ml Ampicillin

2.1.5 Antikörper

In Tabelle 2-4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper bzw. Antisera aufgeführt. Polyklonale Antisera wurden durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen, die von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt wurde.

Ferner ist die Verdünnung angegeben, in der die Antikörper in der Western Blot Analyse eingesetzt wurden.

Tabelle 2-4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Quelle / Referenz
Kaninchen-anti-CPY (polyklonal)	-	A. Finger, Stuttgart
Kaninchen-anti-Der3p (polyklonal)	1:1.000	J. Bordallo, Stuttgart
Kaninchen-anti-Invertase (polyklonal)	1:1.000	R. Kölling, Düsseldorf
Kaninchen-anti-Ubc1p (polyklonal)	1:1.000	T. Sommer, Berlin
Kaninchen-anti-Ubc6p (polyklonal)	1:10.000	T. Sommer, Berlin
Maus-anti-CPY	1:10.000	Molecular Probes, Leiden
Maus-anti-myc-Epitop	1:10.000	Roche, Mannheim
Maus-anti-HA-Epitop	1:10.000	Roche, Mannheim
Maus-anti-Ubiquitin	1:2.500	Oncogene, Boston, USA
anti-Kaninchen-HRPO-Konjugat	1:5.000	Sigma, Deisenhofen
anti-Maus-HRPO-Konjugat	1:10.000	Medac, Hamburg

2.1.6 Enzyme

Die in Tabelle 2-5 aufgelisteten Enzyme wurden, falls verfügbar, in dem jeweils passenden vom Hersteller gelieferten Inkubationspuffer eingesetzt.

Tabelle 2-5: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Quelle
E1-Enzym (aus Hefe)	Affinity, Exeter, GB
E2-Enzym (human/rekombinant)	Affinity, Exeter, GB
Endoglykosidase H	Roche, Mannheim
Restriktions-Endonucleasen	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly, USA

2.1.7 Primer

Synthetische Oligonukleotide für die PCR (Primer) wurden von der Firma MWG Biotech (München) bezogen. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2-6 angegeben.

Tabelle 2-6: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz	verwendet für
Seq-DER2	5'-CCCAAAGGTTACCTTGTGGC-3'	YEp <i>DER3-G</i>
DER3-G5	5'-GCCGCCTCTAGATAGTACTATTATGCTGGATAAATT TATCTGG-3'	YEp <i>DER3-G</i>
5/6 R	5'-GACGGCCAGTGAATTGTAAT-3'	pQ37 bis pD345
DER-TM1	5'-CGGCGGCTCGAGTTGCAAAAAGGAAACGCTTGTC-3'	PQ37
DER-TM2	5'-CGGCGGCTCGAGCTCAATAAGCCTCAGTTCACC-3'	pE78
DER-TM2/3	5'-CGGCGGCTCGAGCCGTTCTGTGGAACAGTGAGG-3'	pR103
DER-TM3	5'-CGGCGGCTCGAGCTGTAATAAGGCCTCCAGCC-3'	pQ134
DER-TM4	5'-CGGCGGCTCGAGTTGTTTTGTATATATGGAGGAG-3'	pQ176
DER-TM5	5'-CGGCGGCTCGAGATCATTTCAGAAATTTGTAGC-3'	pD345
DER-GST1	5'-TTCCTAGAATTCTGTTTGAATTTCTGGGAATTT-3'	pGEX- <i>DER3</i>
DER-GST2	5'-TAAGTCGACACATGCAATCTAGATATGCTGGAT-3'	pGEX- <i>DER3</i>
HRD-Eag	5'-CCGCCGCGGCCGCCAAGAACCACAGATCAGAG-3'	p <i>HRD3-CUB</i>
HRD-Xho	5'-GCCGCCGCTCGAGCCCGAACCTATGGCGAATATCTG AACATTG-3'	p <i>HRD3-CUB</i>
HRD-dupli	5'-GCCGCCGTCGACCCGTAGAGGCTGGAATGTCC-3'	p <i>HRD3^D-CUB</i>
DER-Eag	5'-CCGCCGCGGCCGCCAAAAGGTTACCTTGTGGC-3'	p <i>DER3-CUB</i>
DER-Sal	5'-GCCGCCGTCGACCCCGAACCGATATGCTGGATAAA TTTATC-3'	p <i>DER3-CUB</i>
DER-Bam	5'-CGGCGGCGGATCCCTGGTGACGTGCCAGAAAATAG AAGGAAAC-3'	p <i>NUx-DER3</i>
DER-Eco	5'-GTCCCCCTGTTAATCAGGAATTCCGGCGG-3'	p <i>NUx-DER3</i>
UBC7-Bam	5'-GGCGGCGGATCCCTGGTGACTCGAAAACCGCTCAG AAAC-3'	p <i>NUx-UBC7</i>
UBC7-Eco	5'-GCCGCCGAATTCAATTGATTAACGCTTCGG-3'	p <i>NUx-UBC7</i>

2.1.8 Kits

Tabelle 2-7: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Bezeichnung	Quelle
<i>ECL</i> TM Kit	Amersham, Little Chalfont, GB
<i>QIAEX II Gel Extraction</i> Kit	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification</i> Kit	Qiagen, Hilden

2.1.9 Chemikalien

Tabelle 2-8: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Quelle
Adenin	Sigma, Deisenhofen
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Sigma, Deisenhofen
p-Aminobenzoesäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
L-Arginin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparagin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparaginsäure	Sigma, Deisenhofen
<i>Bacto</i> [®] Agar	Difco, Michigan, USA
<i>Bacto</i> [®] Pepton	Difco, Michigan, USA
<i>Bacto</i> [®] Trypton	Difco, Michigan, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Riedel-De Haën, Seelze
BTPNA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete [™] Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
L-Cystein	Sigma, Deisenhofen
Desoxyadenosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Desoxycytidin-triphosphat	Roche, Mannheim
Desoxyguanosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Desoxythymidin-triphosphat	Roche, Mannheim
Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
DMF	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard (1 kb DNA-Leiter)	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Riedel-De Haën, Seelze
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Filterpapier GB 002 und GB 003	Schleicher & Schuell, Dassel
5-FOA	Toronto Res. Chem., New York, Kanada
D-Galactose	Sigma, Deisenhofen
Glasperlen	B. Braun Biotech, Melsungen
D-Glucose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutaminsäure	Sigma, Deisenhofen
Glutathion	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose [™] 4B	Amersham, Little Chalfont, GB
Glycerin	Riedel-De Haën, Seelze
L-Glycin	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Michigan, USA

Tabelle 2-8 (Forts.)

HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hering-Sperma-DNA	Promega, Madison, USA
<i>L</i> -Histidin	Sigma, Deisenhofen
<i>L</i> -Histidinol	Sigma, Deisenhofen
<i>Hyperfilm</i> TM <i>ECL</i> TM	Amersham, Little Chalfont, GB
myo-Inosit	Sigma, Deisenhofen
IPTG	BTS, St. Leon-Rot
Isobutanol	Riedel-De Haën, Seelze
<i>L</i> -Isoleucin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Riedel-De Haën, Seelze
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
<i>L</i> -Leucin	Sigma, Deisenhofen
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
<i>L</i> -Lysin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Dr. Groß, Sauerlach
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
<i>L</i> -Methionin	Sigma, Deisenhofen
[α - ³⁵ S]- <i>L</i> -Methionin	Amersham, Little Chalfont, GB
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Riedel-De Haën, Seelze
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NC-Membran (<i>Protran BA 70</i>)	Schleicher & Schuell, Dassel
PEG 3350	Sigma, Deisenhofen
Phenol, TE-gesättigt (<i>Roti</i> [®] - <i>Phenol</i>)	Roth, Karlsruhe
<i>L</i> -Phenylalanin	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
<i>L</i> -Prolin	Sigma, Deisenhofen
Protein A Sepharose [®] CL-4B	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Proteinmarker (<i>SeeBlue</i> TM <i>Pre-Stained Standard</i>)	Novex, San Diego, USA
Protogel 30%	Kimberly Research, Atlanta, USA
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 37%	Riedel-De Haën, Seelze
TEMED	Merck, Darmstadt
<i>D</i> -Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma, Deisenhofen
<i>L</i> -Serin	Sigma, Deisenhofen
<i>D</i> -Sorbit	Sigma, Deisenhofen
TCA	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2-8 (Forts.)

L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
Tris	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Ubiquitin	Sigma, Deisenhofen
Ubiquitin-Aldehyd	Sigma, Deisenhofen
Uracil	Sigma, Deisenhofen
L-Valin	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	BTS, St. Leon-Rot
Yeast nitrogen base w/o amino acids	Difco, Michigan, USA

2.1.10 Geräte

Tabelle 2-9: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Bezeichnung	Quelle
Analysenwaage <i>AE 163</i>	Mettler, Giessen, Schweiz
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektroporations-Apparatur <i>Gene Pulser™</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Entwicklungsmaschine <i>Optimax</i>	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
Ionenaustauscher <i>Milli-Q Plus</i>	Millipore, Eschborn
Laborschüttler für Kulturen (div. Größen)	A. Kühner, Birsfelden, Schweiz
Magnetrührer <i>Ikamag® REO</i>	IKA®-Labortechnik, Staufen i. Br.
Netzgerät <i>Power-Pac 300</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR-Maschine <i>Robocycler® Gradient 40</i>	Stratagene, La Jolla, USA
pH-Meter <i>CG 820</i>	Schott, Hofheim
PhosphoImager <i>Storm 860</i>	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Plattformschüttler <i>VSR23</i>	Grant Instruments, Shepreth, GB
Protein-Gelelektrophorese-Apparatur <i>Protean II</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Semidry-Blot-Apparatur	ITF Labortechnik, Wasserburg
Spektralphotometer <i>Novaspec II</i>	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Thermomixer <i>5437</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge <i>5415 C</i>	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Sonifikator <i>Sonic Power</i>	Branson, Danbury, USA
Überkopfschüttler <i>34528</i>	Snijders Scientific, Tilburg, NL
Videoprinter für Agarosegele	MWG Biotech, München
Vortexer <i>Vibrofix VF1</i>	IKA®-Labortechnik, Staufen i. Br.
Waage <i>PM460</i>	Mettler, Giessen, Schweiz
Wasserbad <i>W13/F3</i>	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge <i>Centrikon T-124</i>	Kontron, Neufarn

2.2 Methoden

2.2.1 *S. cerevisiae*-spezifische Methoden

2.2.1.1 Hefekulturen

Hefe-Flüssigkulturen wurden mit Zellen von einer Agarplatte mittels eines sterilen Zahnstochers angeimpft bzw. aus einer Vorkultur mit der jeweils angegebenen Verdünnung umgeimpft. Die Inkubation erfolgte auf einem mit 220 Upm betriebenen Schüttler bei (soweit nicht anders angegeben) 30 °C. Die Zelldichte wurde durch Messung der OD₆₀₀ in einer Verdünnung von 1:10 ermittelt (Extinktion bei 600 nm gegen das reine Medium als Referenz).

Auf Agarplatten wurden Zellen mittels eines sterilen Zahnstochers ausgestrichen oder, ausgehend von Zellsuspensionen, mit einem Trigalski-Spatel ausplattiert bzw. in Verdünnungsreihen aufgetropft.

Für Dauerkulturen wurde eine Zahnstocherspitze Zellmaterial in 1 ml 15% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von Hefezellen (Lithiumacetat-Methode)

Reagenzien:

- LiOAc-Sorb-Puffer pH 8,0:
 - 100 mM Lithiumacetat
 - 10 mM Tris/Acetat
 - 1 mM EDTA
 - 1 M D-Sorbit
- PEG in Li-TE-Puffer pH 8,0:
 - 100 mM Lithiumacetat
 - 10 mM Tris/Acetat
 - 1 mM EDTA
 - 40% PEG 3350
- 10 mg/ml Hering-Sperma-DNA

Durchführung:

Eine 10-ml-Hauptkultur in YPD-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:10 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 °C, 2000 Upm, 5 min), zweimal mit je 10 ml ddH₂O und einmal mit 2,5 ml

LiOAc-Sorb-Puffer gewaschen. Dann wurden sie in 100 μ l LiOAc-Sorb-Puffer resuspendiert und 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 μ l-Aliquots aufgeteilt und mit 300 μ l PEG in Li-TE-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 5 μ l Hering-Sperma-DNA und 1-3 μ g der zu transformierenden DNA wurde 30 min bei 30 °C und anschließend 20 min bei 42 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (RT, 3000 Upm, 15 s), in 1 ml CM-Selektionsmedium aufgenommen und auf CM-Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.1.3 Genaustausch durch homologe Rekombination

Durchführung:

Ein Plasmid mit dem mutierten Allel des zu ersetzenden Gens sowie einem *URA3*-Marker wurde innerhalb der kodierenden Sequenz des Gens linearisiert. Mit dieser linearen DNA wurde der Ausgangsstamm transformiert und auf *ura*⁻-Platten selektioniert. Mit positiven Klonen wurde eine 1 ml-Kultur in YPD beimpft und 8 h inkubiert. 500 μ l dieser Kultur wurden auf einer 5-FOA-Platte ausplattiert und zwei bis drei Tage inkubiert. Von den hochwachsenden Kolonien trug etwa die Hälfte das mutierte und die andere Hälfte das Wildtyp-Allel.

2.2.1.4 Carboxypeptidase Y-Aktivitätstest

Reagenzien:

- Substratlösung: 2,5 mg/ml BTPNA in DMF
- Pufferlösung: 0,1 M Tris/Chlorid pH 7,5

Durchführung:

Substratlösung und Pufferlösung wurden frisch im Verhältnis 1:4 gemischt und je 200 μ l dieser Mischung in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Hierin wurden jeweils eine Zahnstocherspitze Hefezellen resuspendiert, die Vertiefungen luftdicht verschlossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Stämmen mit vorhandener CPY-Aktivität trat eine durch die proteolytische Spaltung des Substrats BTPNA verursachte Gelbfärbung auf.

2.2.1.5 Isolation von DNA aus *S. cerevisiae*

Reagenzien:

- Breaking-Puffer pH 8,0:
 - 100 mM Natriumchlorid
 - 10 mM Tris/Chlorid
 - 1 mM EDTA
 - 1% (w/v) SDS
 - 2% (v/v) Triton-X-100
- Glasperlen (0,4-0,5 mm, neutralisiert)
- Phenol/Chloroform-Lösung:
 - 50% (v/v) Phenol (ges. mit TE-Puffer)
 - 50% (v/v) Chloroform
- 100% Ethanol (-20 °C)
- 10 mg/ml RNase A (DNase-frei durch Erhitzen auf 100 °C)
- 5 M Ammoniumacetat

Durchführung:

1,5 ml einer Übernacht-Kultur in CM-Medium wurden abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 1 min), die Zellen mit 500 µl ddH₂O gewaschen und in 200 µl Breaking-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform-Lösung wurde 2 min bei 37 °C gevortext, dann wurden 200 µl ddH₂O zugegeben und zentrifugiert (RT, 14000 Upm, 5 min). Aus der obersten Phase wurden 200 µl in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml Ethanol (-20 °C) gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (RT, 14000 Upm, 10 min) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 400 µl ddH₂O mit 3 µl RNase A resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde erneut durch Zugabe von 1 ml Ethanol (-20 °C) und 10 µl 5 M Ammoniumacetat gefällt und die DNA abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 10 min). Der Überstand wurde quantitativ entfernt, das DNA-Pellet 20 min bei 37 °C getrocknet und in 40 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 *E. coli*-Kulturen

E. coli-Flüssigkulturen wurden mit Zellen von einer Agarplatte oder aus einer Dauerkultur mittels eines sterilen Zahnstochers angeimpft. Sie wurden über Nacht auf einem mit 220 Upm

betriebenen Schüttler bei 37 °C inkubiert, dann wurden die Zellen geerntet oder laut Vorschrift umgeimpft. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Messung der OD₆₀₀ in einer Verdünnung von 1:10 (Extinktion bei 600 nm gegen das reine Medium als Referenz).

Zellsuspensionen wurden mit Hilfe eines Trigalski-Spatel auf Agarplatten ausplattiert.

Für Dauerkulturen wurden 500 µl Zellsuspension zu 500 µl 60% (v/v) Glycerin gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Reagenzien:

- 10% (v/v) Glycerin (0 °C)

Durchführung:

Eine 600-ml-Hauptkultur des Stammes DH5α oder BL21 in LB-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (0 °C, 6500 Upm, 8 min). Dann wurde unter ständiger Eiskühlung mit 600 ml, 250 ml und schließlich 100 ml eiskaltem 10% Glycerin gewaschen (0 °C, 4500 Upm, 8 min). Die Zellen wurden in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen und in 40 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Durchführung:

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl der zu transformierenden DNA versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation bei 2,3 kV, 400 Ω und 250 µF durchgeführt. Die Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl bis 1 ml auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Plasmid-Isolation aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Reagenzien:

- Lösung 1:
 - 50 mM *D*-Glucose
 - 25 mM Tris/Chlorid pH 8,0
 - 10 mM EDTA
- Lösung 2 (frisch angesetzt):
 - 200 mM Natriumhydroxid
 - 1% SDS
- Lösung 3:
 - 3 M Kaliumacetat
 - 2 M Essigsäure
- 100% Ethanol
- 10 mg/ml RNase A

Durchführung:

1,5 ml einer Übernacht-Kultur in LB_{amp}-Medium wurden abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 10 s) und die Zellen in 100 µl Lösung 1 durch starkes Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 und mehrmaligem Umdrehen des Reaktionsgefäßes wurden sofort 150 µl Lösung 3 zugegeben und erneut gevortext. Nach dem Abzentrifugieren (RT, 14000 Upm, 5 min) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 900 µl Ethanol gefällt. Nach 2 min wurde nochmals zentrifugiert (RT, 14000 Upm, 5 min), der Überstand vollständig entfernt und das Pellet ca. 20 min bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl ddH₂O aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 µl RNase A 30 min bei RT inkubiert. Danach konnte die DNA bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Reagenzien:

- *SuRE/Cut*TM System:
 - Restriktions-Endonuclease (2 bis 10 U/µl in Glycerin)
 - 10fach-Inkubationspuffer A, B, L, M bzw. H
- 10fach-DNA-Probenpuffer pH 8,0:
 - 1 M Tris/Chlorid
 - 50% (v/v) Glycerin
 - 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Durchführung:

Für einen 20- μ l-Verdauansatz wurden zwischen 1 und 10 μ l DNA-Lösung, 0,3-0,5 μ l Endonuclease und 2 μ l des jeweiligen 10fach-Inkubationspuffers eingesetzt. Es wurde mit ddH₂O auf 20 μ l aufgefüllt und 1 bis 2 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 2 μ l 10fach-DNA-Probenpuffer abgebrochen und eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.2.2.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien:

- TAE-Puffer pH 7,5:
 - 40 mM Tris/Acetat
 - 2 mM EDTA
- TBE-Puffer pH 7,5:
 - 90 mM Tris
 - 90 mM Borsäure
 - 2 mM EDTA
- Agarose-Gel in TAE- bzw. TBE-Puffer:
 - 0,8-1,5% (w/v) Agarose
 - 1 μ g/ml Ethidiumbromid
- DNA-Längenstandard:
 - 10% (v/v) 10fach-DNA-Probenpuffer
 - 10% (v/v) 10fach-Inkubationspuffer M
 - 0,1 mg/ml 1 kb DNA-Leiter

Durchführung:

Die Laufkammer wurde, je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente, mit TAE- oder TBE-Puffer befüllt und die DNA-Proben (mit 10% 10fach-DNA-Probenpuffer) in die Taschen des Agarose-Gels einpipettiert (10 bis 30 μ l gegen 5 μ l DNA-Längenstandard). Die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 110 V aufgetrennt (Laufzeit 20 bis 50 min) und das Gel unter UV-Licht fotografiert. Die durch das eingelagerte Ethidiumbromid fluoreszierenden Banden konnten optisch ausgewertet werden.



2.2.2.7 Gelextraktion von DNA (präparative DNA-Gelelektrophorese)

Reagenzien:

- *QIAEX II Gel Extraction Kit*:
 - Puffer QX1
 - QIAEX II Suspension
 - Puffer PE

Durchführung:

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mittels eines Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß eingewogen. Zu je 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer QX1 zugefügt, dann wurden 10 µl QIAEX II Suspension (zuvor 30 s gevortext) zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 50 °C inkubiert und dabei mehrmals gevortext. Es wurde abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 30 s), der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit je 500 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde das Pellet 15-30 min bei RT getrocknet, in 20 µl ddH₂O resuspendiert und zur Elution der DNA 5 min bei RT inkubiert. Es wurde abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 30 s) und die gereinigte DNA-Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Reagenzien:

- T4-DNA-Ligase (5 U/µl in Glycerin)
- 10fach Ligationspuffer

Durchführung:

Pro Ansatz wurden je 0,5 bis 6 µl DNA-Lösung, 0,3 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl 10fach Ligationspuffer mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt und über Nacht bei 18 °C inkubiert.

2.2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Reagenzien:

- DNA-Polymerase:
 - Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl in Glycerin)
 - Vent-DNA-Polymerase (2 U/µl in Glycerin)
- 10fach Polymerasepuffer

- 10 mM dNTPs
- 30 mM Magnesiumchlorid
- 100 mM Magnesiumsulfat
- Mineralöl

Durchführung:

Pro Ansatz wurden 5 µl Polymerasepuffer, je 50 pmol Primer-DNA, 1 µl Template-DNA und 0,5 µl DNA-Polymerase eingesetzt. Bei Verwendung von Taq-DNA-Polymerase wurden 1 µl Magnesiumchlorid, bei Verwendung von Vent-DNA-Polymerase 0,5 µl Magnesiumsulfat zugegeben. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 48 µl aufgefüllt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsgefäße wurden in die PCR-Maschine eingesetzt und diese gestartet. Während des ersten Denaturierungsschrittes wurden 2 µl dNTPs zugegeben. Das verwendete Temperaturprogramm wurde jeweils auf die eingesetzten Primer (vgl. Tabelle 2-6) sowie die Produktgröße abgestimmt. Nach Beendigung der Programms wurde die Produktbildung durch DNA-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten

Reagenzien:

- *QIAquick PCR Purification Kit*:
 - Puffer PB
 - Puffer PE
 - Puffer EB

Durchführung:

Zum PCR-Reaktionsansatz wurde die 5fache Menge Puffer PB gegeben und das Reaktionsprodukt laut Vorschrift des Herstellers an eine Polymermatrix gebunden. Nach einem Waschschrift mit 750 µl Puffer PE wurde die DNA mit 30 µl Puffer EB eluiert.

2.2.2.11 Sequenzierung von DNA

Reagenzien:

- „Premix“ (enthält Polymerase, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und Puffersubstanzen)
- 30 mM Magnesiumchlorid
- Mineralöl

Durchführung:

Ein Sequenzier-Ansatz enthielt 4 μl „Premix“, 5 μl DNA, 2 μl Primer (1:10 verdünnt), 1 μl Magnesiumchlorid und 8 μl ddH₂O. Er wurde mit 20 μl Mineralöl überschichtet und in der PCR-Maschine 25 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 40 s, einer Annealing-Phase von 30 s und einer Elongationsphase von 4 min unterworfen.

Die Auftrennung und fluorimetrische Auswertung der entstandenen Fragmente erfolgte am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

Reagenzien:

- Lyse-Lösung (frisch angesetzt):
 - 1,85 M Natriumhydroxid
 - 7,5% (v/v) β -Mercaptoethanol
- Harnstoffpuffer pH 6,8:
 - 8 M Harnstoff
 - 200 mM Tris/Chlorid
 - 0,1 mM EDTA
 - 5% (w/v) SDS
 - 0,03% (w/v) Bromphenolblau
 - 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)
- 50% (w/v) TCA
- 2 M Tris

Durchführung:

Eine 4-ml-Hauptkultur in CM-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur 1:100 angeimpft und über Nacht inkubiert. Für den Aufschluß wurden 3 OD₆₀₀ Zellen in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt und mit 150 μl Lyse-Lösung versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis unter mehrmaligem Vortexen wurden 150 μl 50% TCA zugegeben, gevortext und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 10 min), der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet in 100 μl Harnstoffpuffer mit 2 μl 2 M Tris bei 37 °C unter Vortexen resuspendiert. Vor dem Auftragen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 5 min).

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Reagenzien:

- Trenngel:
 - 375 mM Tris/Chlorid pH 8,8
 - 27% (v/v) Protogel 30%
 - 0,1% (w/v) SDS
 - 0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
 - 0,05% (v/v) TEMED
- Sammelgel:
 - 125 mM Tris/Chlorid pH 6,8
 - 13% (v/v) Protogel 30%
 - 0,1% (w/v) SDS
 - 0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
 - 0,1% (v/v) TEMED
- Elektrophoresepuffer:
 - 25 mM Tris
 - 200 mM L-Glycin
 - 0,1% (w/v) SDS
- Isobutanol (gesättigt mit ddH₂O)
- Proteinmarker (*SeeBlue™ Pre-Stained Standard*)

Durchführung:

Es wurden jeweils 10 ml Trenn- und Sammelgel frisch zubereitet und nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat und TEMED sofort zwischen die Glasplatten der zusammengebauten Elektrophorese-Apparatur eingefüllt. Pro Gel wurden zunächst 4 ml Trenngel eingefüllt und während der Polymerisation (ca. 30 min) mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Anschließend wurde die Apparatur mit dem Sammelgel aufgefüllt und der Kamm eingesetzt.

Die Laufkammer wurde mit 800 ml Elektrophoresepuffer gefüllt und je 10-30 µl der Proteinproben gegen 7,5 µl Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20-25 mA betrieben, so daß die Spannung zu Beginn bei ca. 100 V lag und bis zum Erreichen des Trenngels auf 150 V anstieg.

2.2.3.3 Western-Blot-Analyse

Reagenzien:

- Blotting-Puffer:
 - 192 mM *L*-Glycin
 - 25 mM Tris
 - 20% (v/v) Methanol
- PBST-Puffer pH 7,5:
 - 16 mM Natriumhydrogenphosphat
 - 4 mM Natriumdihydrogenphosphat
 - 100 mM Natriumchlorid
 - 0,1% (v/v) Tween 20
- Stripping-Puffer pH 6,7:
 - 100 mM β -Mercaptoethanol
 - 62,5 mM Tris/Chlorid
 - 2% (w/v) SDS
- NC-Membran (*Protran BA 70*)
- Magermilchpulver
- Primärantikörper
- Sekundärantikörper (HRPO-Konjugat)
- *ECL*TM Kit:
 - Detection reagent 1
 - Detection reagent 2
- *Hyperfilm*TM *ECL*TM

Durchführung:

Pro Gel wurden 6 Filterpapiere GB 002 (5 * 9 cm) und eine NC-Membran (4,5 * 8,5 cm) in Blotting-Puffer äquilibriert und der Blot zwischen den beiden Elektroden einer Semidry-Blot-Apparatur wie folgt aufgebaut: Auf die Kathode wurden 3 Filterpapiere gelegt, darauf das SDS-Gel, die NC-Membran und nochmals 3 Filterpapiere. Die Kammer wurde verschlossen, mit ca. 2 kg Gewicht beschwert und die Proteine 90 min bei einer Stromstärke von 90 mA pro Gel auf die NC-Membran übertragen.

Alle nachfolgenden Inkubationen der NC-Membran wurden jeweils in 25 ml der angegebenen Lösung auf einem Plattformschüttler bei RT durchgeführt: 1-16 h in in PBST mit 10% Magermilchpulver, 5 min in PBST, 1 h im entsprechend verdünnten Primärantikörper (vgl. Tabelle 2-4), dreimal 5 min in PBST, 1 h im Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 2-4), sechsmal 5 min in PBST.

Nach dem letzten Waschen wurde auf die Membran 1 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung aus Detection reagent 1 und 2 aufgetragen. Nach 1 min wurde die Lösung entfernt, die Membran in eine Filmkassette gelegt, ein Film zur Belichtung aufgelegt und anschließend maschinell entwickelt.

Zur Anfärbung der Membran mit einem weiteren Antikörper wurde der erste Antikörper durch 30 min Inkubation in 25 ml Stripping-Puffer bei 60 °C entfernt. Dann wurde zweimal 5 min in je 100 ml PBST gewaschen und anschließend die oben beschriebene Prozedur wiederholt, beginnend mit der Inkubation in PBST mit 10% Magermilchpulver.

2.2.3.4 Pulse-Chase-Analyse

Reagenzien:

- BB1-Puffer pH 7,5:
 - 6 M Harnstoff
 - 50 mM Tris/Chlorid
 - 1% (w/v) SDS
 - 1 mM EDTA
- IP-Puffer pH 7,5:
 - 190 mM Natriumchlorid
 - 50 mM Tris/Chlorid
 - 6 mM EDTA
 - 1,25% Triton-X-100
- [α -³⁵S]-L-Methionin
- 110% (w/v) TCA
- 100% Ethanol (-20 °C)
- Glasperlen (0,4-0,5 mm, neutralisiert)
- 200 mM PMSF in Ethanol
- Complete™ Protease Inhibitor
- Kaninchen-anti-CPY, polyklonal
- Protein A Sepharose® CL-4B

Durchführung:

Eine 10-ml-Hauptkultur in CM-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:300 bis 1:1200 angeimpft und über Nacht inkubiert. 10 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet (RT, 2000 Upm, 5 min), dreimal mit je 5 ml Labelling-Medium gewaschen und in 1 ml Labelling-Medium resuspendiert. Nach einer 50minütigen Inkubation bei der jeweiligen Wachstumstemperatur wurden 25 μ l [α -³⁵S]-L-Methionin zugegeben und 20 min weiter

inkubiert („Pulse“). Die Zugabe von 1 ml Chase-Medium markierte den Nullpunkt des „Chase“, während dessen Verlauf bei den jeweils angegebenen Zeitpunkten je 450 µl der Zellsuspension auf 50 µl 110% TCA in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert und nach Beendigung des Chase durch Vortexen aufgetaut. Die Zellen wurden abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 8 min), der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit je 1 ml kaltem Ethanol gewaschen und 3 min bei 60 °C getrocknet. Dann wurden 100 µl BB1-Puffer und 60 µl Glasperlen zugegeben und die Proben zuerst 3 min auf 95 °C erhitzt und dann 2 min gevortext. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt, worauf 1 ml IP-Puffer sowie 5 µl PMSF und 5 µl Complete™ Protease Inhibitor zugegeben wurden. Die Proben wurden über Nacht bei -80 °C gelagert, durch Vortexen aufgetaut und zentrifugiert (RT, 14000 Upm, 15 min). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 5 µl polyklonalem CPY-Antikörper auf einem Überkopf-Schüttler bei RT inkubiert. Nach 2 h wurden 5,6 mg Protein A Sepharose® in 80 µl IP-Puffer ohne Triton-X-100 zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Die Sepharose wurde pelletiert (RT, 2000 Upm, 20 s) und fünfmal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. Dann wurden 60 µl Harnstoffpuffer zugegeben, 8 min bei 95 °C inkubiert und abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 5 min). Die Proteinproben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel bei 70 °C unter Vakuum auf dem Gelrockner getrocknet. Dann wurde in einer Filmkassette ein Röntgenfilm aufgelegt, um den Proteinabbau optisch sichtbar zu machen. Zur Quantifizierung des Abbaus wurde eine PhosphoImager-Plate aufgelegt, die anschließend im PhosphoImager eingescannt wurde. Die dadurch erhaltenen Daten konnten per Computer ausgewertet werden.

2.2.3.5 Expression von GST-Fusionsproteinen

Reagenzien:

- PBS-Puffer pH 7,3:
 - 140 mM Natriumchlorid
 - 2,7 mM Kaliumchlorid
 - 10 mM Natriumhydrogenphosphat
 - 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
- Elutionspuffer pH 8,0:
 - 50 mM Tris/Chlorid
 - 10 mM Glutathion
- 100 mM IPTG
- 200 mM PMSF in Ethanol

- Complete™ Protease Inhibitor
- 20% (v/v) Triton-X-100 in PBS-Puffer
- 50% (v/v) Glutathion Sepharose™ 4B in PBS-Puffer

Durchführung:

Eine 250-ml-Kultur des *E. coli*-Stammes BL21 mit dem entsprechenden GST-Expressionsplasmid wurde mit einer stationären Vorkultur 1:100 angeimpft und 3-4 h bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml IPTG wurde weitere 3 h inkubiert, die Zellen geerntet (4 °C, 7500 Upm, 10 min) und in 12 ml PBS-Puffer mit je 60 µl PMSF und Complete™ Protease Inhibitor aufgenommen. Die Zellen wurden unter Eiskühlung mittels eines Ultraschall-Sonifikators aufgeschlossen (zweimal je 10 s), mit 600 µl 20% Triton-X-100 versetzt und 30 min bei RT auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (4 °C, 10000 Upm, 10 min) wurde der Überstand 1 h mit 100 µl Glutathion Sepharose™ bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wurde pelletiert (RT, 2000 Upm, 1 min) und dreimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Das an die Sepharose gebundene GST-Fusionsprotein wurde entweder für GST-Interaktions-Studien verwendet oder mit freiem Glutathion von der Matrix eluiert. Hierzu wurden 100 µl Elutionspuffer zugegeben und die Sepharose nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT pelletiert, wobei der Überstand das Fusionsprotein enthält.

2.2.3.6 GST-Interaktionsstudien

Reagenzien:

- Glasperlen (0,4-0,5 mm, neutralisiert)
- 500 mM Natriumchlorid in PBS-Puffer

Durchführung:

Eine 30-ml-Hauptkultur des entsprechenden Hefestammes in CM-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:300 bis 1:1200 angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (4 °C, 2000 Upm, 5 min), zweimal mit je 10 ml ddH₂O gewaschen und in 400 µl PBS mit je 5 µl PMSF und Complete™ Protease Inhibitor aufgenommen. Es wurden 400 µl Glasperlen zugegeben und die Proben 20 min bei 4 °C gevortext. Nach dem Abzentrifugieren (4 °C, 2000 Upm, 5 min) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert (4 °C, 14000 Upm, 15 min).

Der Überstand wurde mit PBS-Puffer auf 1 ml aufgefüllt und mit dem an Glutathion Sepharose gebundenen GST-Fusionsprotein über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Sepharose wurde pelletiert (RT, 2000 Upm, 1 min) und mit 1 ml 500 mM Natriumchlorid in PBS-Puffer gewaschen. Die Proteine im Überstand sowie in der Waschlösung wurden durch Zugabe von 150 µl 50% TCA gefällt, abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 10 min) und in 100 µl Harnstoffpuffer aufgenommen. Die an der Sepharose gebundenen Proteine wurden bei 95 °C mit 100 µl Harnstoffpuffer eluiert.

2.2.3.7 *In vitro*-Ubiquitylierung von Der3/Hrd1p

Reagenzien:

- Ubiquitylierungs-Puffer pH 7,5:
 - 50 mM Natriumchlorid
 - 25 mM Tris/Chlorid
 - 10 mM Magnesiumchlorid
 - 10 mM ATP
 - 1 mM Dithiothreit
- Ubiquitin
- E1-Enzym
- E2-Enzym

Durchführung:

Ein 20-µl-Reaktionsansatz in Ubiquitylierungs-Puffer enthielt 10 µg Ubiquitin, 0,5 µg E1-Enzym, 1 µg E2-Enzym und ca. 1 µg GST-Der3-Fusionsprotein. Nach 60 min Inkubation bei 30 °C wurde der Ansatz mit PBS-Puffer auf 1 ml verdünnt, mit 20 µl Glutathion Sepharose versetzt und 3 h bei 4 °C auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Sepharose wurde pelletiert (RT, 2000 Upm, 1 min), dreimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen und gebundene Proteine in 50 µl Harnstoffpuffer bei 95 °C eluiert.

2.2.3.8 Immunopräzipitation ubiquitylierter CPY*

Reagenzien:

- IP-Puffer pH 7,5:
 - 190 mM Natriumchlorid
 - 50 mM Tris/Chlorid
 - 6 mM EDTA
 - 1,25% Triton-X-100

- 10 mM Kupfersulfat
- Kaninchen-anti-CPY, polyklonal
- Protein A Sepharose[®] CL-4B

Durchführung:

Eine 50-ml-Hauptkultur des entsprechenden Hefestammes in CM-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:300 bis 1:1200 angeimpft und über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl 10 mM Kupfersulfat wurde 4 h weiter inkubiert, dann wurden 100 OD₆₀₀ Zellen geerntet (RT, 2000 Upm, 5 min) und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die Proteine wurden in 500 µl Harnstoffpuffer aufgenommen, mit IP-Puffer im Verhältnis 1:20 verdünnt, mit 5 µl CPY-Antikörper versetzt und 2 h auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5,6 mg Protein A Sepharose[®] in 80 µl IP-Puffer wurde weitere 2 h inkubiert, dann wurde die Sepharose pelletiert (RT, 2000 Upm, 20 s), fünfmal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und gebundene Proteine bei 95 °C in 60 µl Harnstoffpuffer eluiert.

2.2.3.9 Deglykosylierung von Der3-Suc2-His4-Fusionsproteinen

Reagenzien:

- TBS-Puffer pH 7,6:
 - 200 mM Natriumchlorid
 - 20 mM Tris/Chlorid
- Lysepuffer pH 7,5:
 - 140 mM Natriumchlorid
 - 50 mM HEPES/Kaliumhydroxid
 - 1 mM EDTA
 - 10% (v/v) Glycerin
 - 2% (v/v) Triton-X-100
 - 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat
 - 0,1% (w/v) SDS
 - 1 mM PMSF (frisch zugesetzt)
 - 0,5% (v/v) Complete[™] Protease Inhibitor (frisch zugesetzt)
- Waschpuffer pH 5,5:
 - 50 mM Kaliumphosphat
 - 0,02% (w/v) SDS
 - 1 mM PMSF (frisch zugesetzt)
 - 0,5% (v/v) Complete[™] Protease Inhibitor (frisch zugesetzt)
- Glasperlen (0,4-0,5 mm, neutralisiert)
- Kaninchen-anti-Invertase, polyklonal
- Protein A Sepharose[®] CL-4B

- β -Mercaptoethanol
- Endoglykosidase H (5 U/ml)

Durchführung:

Eine 30-ml-Hauptkultur des entsprechenden Hefestammes in CM-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:300 bis 1:1200 angeimpft und über Nacht inkubiert. 30 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet (4 °C, 2000 Upm, 5 min), zweimal mit je 10 ml kaltem TBS-Puffer gewaschen und in 400 μ l Lysepuffer resuspendiert. Es wurden 400 μ l Glasperlen zugegeben und die Proben 20 min bei 4 °C gevortext. Nach dem Abzentrifugieren (4 °C, 2000 Upm, 5 min) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert (4 °C, 14000 Upm, 15 min). Der Überstand wurde mit 10 μ l Invertase-Antikörper versetzt und 3 h bei 4 °C auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Dann wurden 240 μ l Lysepuffer zugegeben, der Ansatz halbiert und die beiden Aliquots nach Zugabe von je 5,6 mg Protein A Sepharose[®] in 80 μ l Lysepuffer 1 h weiterinkubiert. Die Sepharose wurde pelletiert (RT, 2000 Upm, 20 s), fünfmal mit je 1,4 ml Lysepuffer und einmal mit 1,4 ml Waschlösung gewaschen. Nach Zugabe von 25 μ l Waschlösung und 0,175 μ l β -Mercaptoethanol wurde einer der beiden Aliquots mit 2 μ l Endoglykosidase H versetzt und die Ansätze 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 25 μ l Harnstoffpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel wurde zentrifugiert (RT, 14000 Upm, 5 min).

2.2.3.10 Membranextraktion von Proteinen

Reagenzien:

- TE-Puffer pH 7,5:
 - 50 mM Tris/Chlorid
 - 10 mM EDTA
 - 1 mM PMSF (frisch zugesetzt)
 - 0,5% (v/v) Complete[™] Protease Inhibitor (frisch zugesetzt)
- 200 mM Natriumcarbonat
- 5 M Harnstoff
- 2% (v/v) Triton-X-100

Durchführung:

Eine 50-ml-Hauptkultur des entsprechenden Hefestammes in CM-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis 1:300 bis 1:1200 angeimpft und über Nacht inkubiert.

50 OD₆₀₀ Zellen wurden geerntet (4 °C, 2000 Upm, 5 min), mit 15 ml kaltem TBS-Puffer gewaschen und in 800 µl TE-Puffer resuspendiert. Es wurden 800 µl Glasperlen zugegeben, die Probe auf zwei Reaktionsgefäße und verteilt 20 min bei 4 °C gevortext. Nach dem Abzentrifugieren (4 °C, 2000 Upm, 5 min) wurde der vereinigte Überstand mit TE-Puffer auf 1 ml verdünnt und in vier Aliquots zu je 250 µl aufgeteilt. Je eine der Proben wurde mit jeweils 250 µl TE-Puffer, sowie entweder Natriumcarbonat, Harnstoff oder Triton-X-100 versetzt, kurz gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (4 °C, 14000 Upm, 30 min) und der Überstand von der Membranfraktion (Pellet) getrennt. Das Pellet wurde in 50 µl Harnstoffpuffer resuspendiert, die Proteine im Überstand wurden mit 125 µl 50% TCA gefällt, abzentrifugiert (RT, 14000 Upm, 10 min) und in 50 µl Harnstoffpuffer aufgenommen. Mit den Proben wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.



3 Ergebnisse

3.1 Die Membrantopologie von Der3/Hrd1p

3.1.1 Das ER-Membranprotein Der3/Hrd1p

Das Gen *DER3/HRD1* (ORF-Nummer YOL013C) kodiert für ein Protein mit 551 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 63,5 kDa.

Der aminoterminal Bereich mit den ersten 209 Aminosäuren ist stark hydrophob und beinhaltet fünf bis sechs Transmembrandomänen (s.u.). An den Positionen 58 und 137 befinden sich jeweils Asparaginreste, die Bestandteil von potentiellen Erkennungssequenzen für N-Glykosylierung sind. Im carboxyterminalen Bereich, zwischen den Aminosäuren 349 und 399, besitzt Der3/Hrd1p ein RING-H2-Finger-Motiv aus sechs Cysteinresten und zwei Histidinresten (vgl. Abbildung 3-1).

Durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation und Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Der3/Hrd1p am ER lokalisiert ist und somit eine Komponente der ER-Membran darstellt. Das Protein wird nicht glykosyliert. Die Deletion des Gens oder die Mutation des letzten Cysteinrestes der RING-Finger-Domäne zu Serin (C399S) führt zur Stabilisierung von CPY* und Hmg2p (Bordallo *et al.*, 1998; Bordallo und Wolf, 1999; Gardner *et al.*, 2000).

Der RING-Finger als charakteristische Domäne einer Reihe von E3-Enzymen (vgl. Abschnitt 1.3.2) legt die Vermutung nahe, dass auch Der3/Hrd1p eine solche Funktion bei der Ubiquitylierung von ERAD-Substraten übernehmen könnte.

Frühere Untersuchungen durch Protease-Schutz-Experimente deuteten auf eine ER-lumenale Orientierung des carboxyterminalen, hydrophilen Bereichs von Der3/Hrd1p hin – was eine direkte Rolle des RING-Finger-Motivs bei der Ubiquitylierung unwahrscheinlich machen würde (Bordallo *et al.*, 1998). Solche Experimente, die auf der proteolytischen Sensitivität des Proteins in isolierten Membranvesikeln beruhen, können jedoch zu falschen Ergebnissen führen, wenn sich die Membranen während der Präparation zusammenlagern oder sich das untersuchte Protein auf Grund seiner Faltung als resistent gegenüber der eingesetzten Protease erweist (Franzsoff *et al.*, 1991).

Daher war es für die Analyse der Funktion von Der3/Hrd1p zunächst unerlässlich, eine exakte Bestimmung der Membrantopologie des Proteins durchzuführen.

1 M V P E N R R K Q L A I F V V V T Y L L T F Y C V Y S A T K
 31 T S V S F L Q V T L K L N E G F N L M V L S I F I L L N S T
 61 L L W Q L L T K L L F G E L R L I E H E H I F E R L P F T I
 91 I N T L F M S S L F H E R Y F F T V A F F G L L L L Y L K V
 121 F H W I L K D R L E A L L Q S I N D S T T M K T L I F S R F
 151 S F N L V L L A V V D Y Q I I T R C I S S I Y T N Q K S D I
 181 E S T S L Y L I Q V M E F T M L L I D L L N L F L Q T C L N
 211 F W E F Y R S Q Q S L S N E N N H I V H G D P T D E N T V E
 241 S D Q S Q P V L N D D D D D D D D R Q F T G L E G K F M Y
 271 E K A I D V F T R F L K T A L H L S M L I P F R M P M M L L
 301 K D V V W D I L A L Y Q S G T S L W K I W R N N K Q L D D T
 331 L V T V T V E Q L Q N S A N D D N I **C** I I **C** M D E L I H S P
 361 N Q Q T W K N K N K K P K R L P **C** G **H** I L **H** L S **C** L K N W M
 391 E R S Q T **C** P I **C** R L P V F D E K G N V V Q T T F T S N S D
 421 I T T Q T T V T D S T G I A T D Q Q G F A N E V D L L P T R
 451 T T S P D I R I V P T Q N I D T L A M R T R S T S T P S P T
 481 W Y T F P L H K T G D N S V G S S R S A Y E F L I T N S D E
 511 K E N G I P V K L T I E N H E V N S L H G D G G E Q I A K K
 541 I V I P D K F I Q H I

Abb. 3-1: Die Aminosäuresequenz von Der3/Hrd1p. Der aminoternale hydrophobe Bereich sowie die Aminosäuren des RING-H2-Fingers sind grau unterlegt. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen.

3.1.2 Bestimmung der Orientierung des Carboxyterminus von Der3/Hrd1p

Um entscheiden zu können, auf welcher Seite der ER-Membran sich der Carboxyterminus von Der3/Hrd1p befindet, fügte ich eine Erkennungssequenz für N-Glykosylierung zwischen der letzten und der vorletzten Aminosäure des Proteins ein (vgl. Abbildung 3-2).

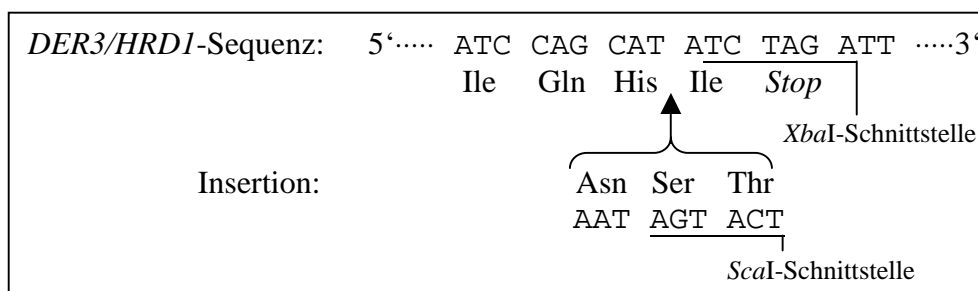


Abb. 3-2: Insertion einer Erkennungssequenz für N-Glykosylierung am Carboxyterminus von Der3/Hrd1p.

Ausgehend von dem Plasmid YEpDER3, welches das chromosomale *Bam*HI/*Hind*III-Fragment mit dem kompletten *DER3/HRD1*-Gen unter seinem nativen Promotor enthält, amplifizierte ich mittels PCR das Teilstück von der *Bgl*III- bis zur der *Xba*I-Schnittstelle, die sich exakt am Stop-Kodon befindet. Die zusätzlich insertierten Basen, die für die Aminosäuren Asn, Ser und Thr kodieren, ergaben gleichzeitig eine *Sca*I-Schnittstelle, die für die Identifikation korrekter Klone hilfreich war. Der Vektor wurde mit den Enzymen *Bgl*III und *Xba*I geschnitten und das mit denselben Enzymen verdaute PCR-Produkt eingesetzt. Das resultierende Plasmid YEpDER3-G kodiert für das modifizierte Protein Der3-G mit der carboxyterminalen Glykosylierungsstelle, wobei ein Fragment von 117 bp hinter dem Stop-Kodon verloren ging (vgl. Abbildung 3-3).

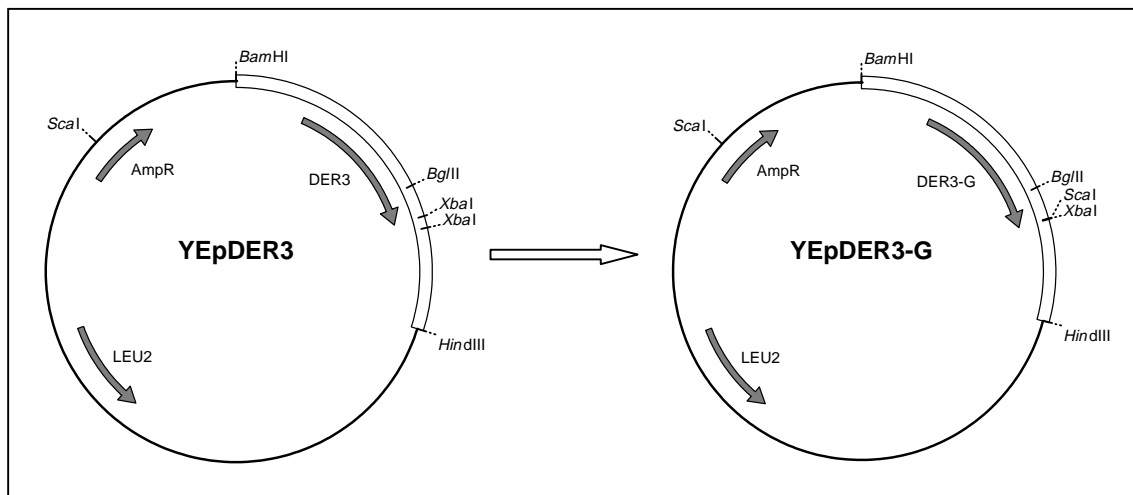


Abb. 3-3: Plasmidkarten der Vektoren YEpDER3 und YEpDER3-G.

Eine ER-lumenale Orientierung des Carboxyterminus würde zur N-Glykosylierung am eingefügten Asparaginrest und somit zur Erhöhung des Molekulargewichts um etwa 2 kDa führen.

Das Plasmid YEpDER3-G wurde in einen Wildtyp-Stamm und eine Δ *Der3* Deletionsmutante transformiert und die resultierenden Stämme durch Western-Blot-Analyse mit gegen Der3/Hrd1p gerichteten Antikörpern untersucht (vgl. Abbildung 3-4). Das Protein Der3-G wird in vergleichbarer Menge zum Wildtyp-Protein exprimiert (Spuren 1 und 2). Die beiden Moleküle laufen im Gel jedoch auf gleicher Höhe, bei Co-Expression beider Formen ist nur eine einzelne Bande erkennbar (Spur 3). Als Vergleich diente eine entsprechend modifizierte Form von CPY*, die ebenfalls eine zusätzliche Glykosylierungsstelle am Carboxyterminus trägt und von dem Plasmid pRS313-*prc1-G5* exprimiert wurde (Plempner *et al.*, 1999b). Co-Expression von CPY* und CPY*-G5 führt zum Auftreten einer deutlichen Doppelbande in der Western-Blot-Analyse mit CPY-Antikörpern (Spuren 4 und 5).

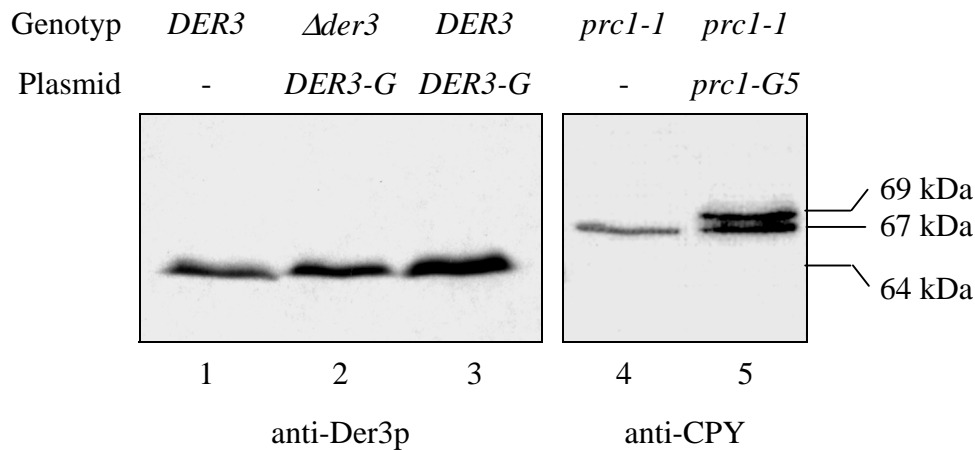


Abb. 3-4: Western-Blot-Analyse der Proteine Der3-G und CPY*-G5.

Durch N-Glykosylierung an der carboxyterminalen Erkennungssequenz erhöht sich das Molekulargewicht von CPY*-G5 gegenüber CPY* von 67 auf 69 kDa. Da Der3/Hrd1p mit 64 kDa ein sehr ähnliches Molekulargewicht hat, kann man von einer vergleichbaren Auftrennung in der Gelelektrophorese ausgehen. Ein auf 66 kDa erhöhtes Molekulargewicht bei Der3-G sollte daher wie bei CPY*-G5 zu einer sichtbaren Doppelbande führen.

Das unterschiedliche Verhalten von Der3-G und CPY*-G5 deutet darauf hin, dass die am Carboxyterminus von Der3-G eingefügte Erkennungssequenz im Gegensatz zu derjenigen von CPY*-G5 nicht erkannt und glykosyliert wird und sich folglich dieser Bereich des Moleküls sehr wahrscheinlich nicht im Lumen des ER befindet.

3.1.3 Bestimmung der Membrantopologie von Der3/Hrd1p

Um die Orientierung des carboxyterminalen Bereiches von Der3/Hrd1p zu bestätigen und zusätzlich auch die exakte Topologie des aminoterminalen Bereiches zu bestimmen, bediente ich mich eines Topologie-sensitiven Reporterproteins (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Bei dieser Methode wird an verschiedene aminoterminalen Fragmente eines Membranproteins zunächst ein Fragment von Invertase (Suc2p), gefolgt von dem Enzym Histidinol-Dehydrogenase (His4p) angehängt. Ein solches Konstrukt gibt Auskunft über die Orientierung des Punktes, an dem das Fragment des zu untersuchenden Proteins endet: Befindet sich His4p im Zytosol von Histidin-auxotrophen Zellen, kann es dort die Umsetzung von Histidinol zu Histidin katalysieren, was zu Histidin-Prototrophie der Zellen führt; gleichzeitig kann das Suc2-Fragment nicht glykosyliert werden. Auf der anderen Seite führt eine ER-lumenale Orientierung zur Glykosylierung der 13 Akzeptorsequenzen innerhalb des

Suc2-Fragments, die mittels Western-Blot-Analyse sichtbar gemacht werden kann; gleichzeitig kann die Histidin-Auxotrophie nicht komplementiert werden. Somit führen beide Alternativen zu einem positiven, d.h. messbaren Ergebnis (vgl. Abbildung 3-5).

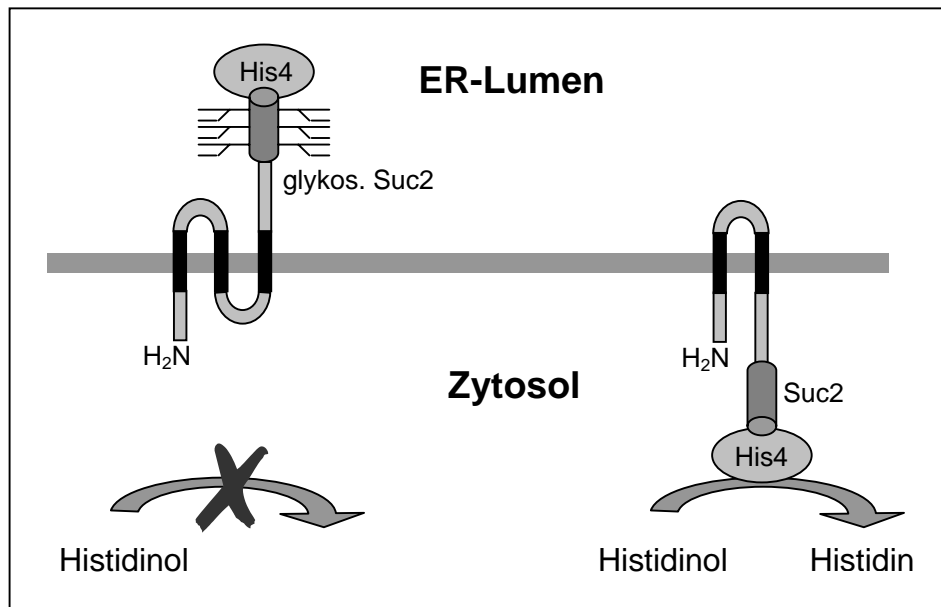


Abb 3-5: Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips von Suc2-His4-Fusionsproteinen.

Für die Auswahl der in Bezug auf ihre Orientierung zu untersuchenden Der3/Hrd1-Fragmente legte ich zwei verschiedene computergestützte Vorhersagen für das Auftreten von Transmembrandomänen zu Grunde.

Beim Hydrophathie-Profil nach Kyte und Doolittle ist jeder Aminosäure ein ΔG -Wert, entsprechend der bei der Ausbildung einer Hydrathülle frei werdenden Enthalpie, zugeordnet. Die Summierung dieser Werte über die Länge von i.d.R. jeweils 17 Aminosäuren ergibt ein Profil, in dem Bereiche mit hohen Werten potentielle Membrandomänen repräsentieren (Kyte und Doolittle, 1982).

Die DAS-Methode („dense alignment surface“) ist spezifischer und ermittelt einen Wert aus Homologie-Vergleichen zwischen der Sequenz des Proteins und bekannten Transmembran-Sequenzen von Proteinen aus einer Datenbank. Bereiche mit einem DAS-Wert von über 2,2 sind dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit Transmembrandomänen (Cserzo *et al.*, 1997).

In Abbildung 3-6 sind beide Profile für das Protein Der3/Hrd1p dargestellt. Sie prognostizieren beide die Existenz von bis zu sechs Membrandomänen im aminoterminalen Bereich der ersten 209 Aminosäuren von Der3/Hrd1p (nummerierte graue Balken). Allerdings liegt die Domäne III im Hydrophathie-Profil sehr dicht an der Domäne IV und erreicht im DAS-Profil nur knapp den Wert von 2,2. Daher wäre auch ein Modell denkbar, in dem die Bereiche

III und IV gemeinsam eine Transmembrandomäne bilden und das Protein insgesamt nur fünf solcher Domänen enthält.

Zur Bestimmung der Membrantopologie stellte ich sechs verschiedene Fusionsproteine her, die ein aminoterminalen Fragment von Der3/Hrd1p bis zur jeweiligen in Abbildung 3-6 gekennzeichneten Aminosäure enthalten. Daran schließen sich carboxyterminal das Suc2-Fragment und His4p an.

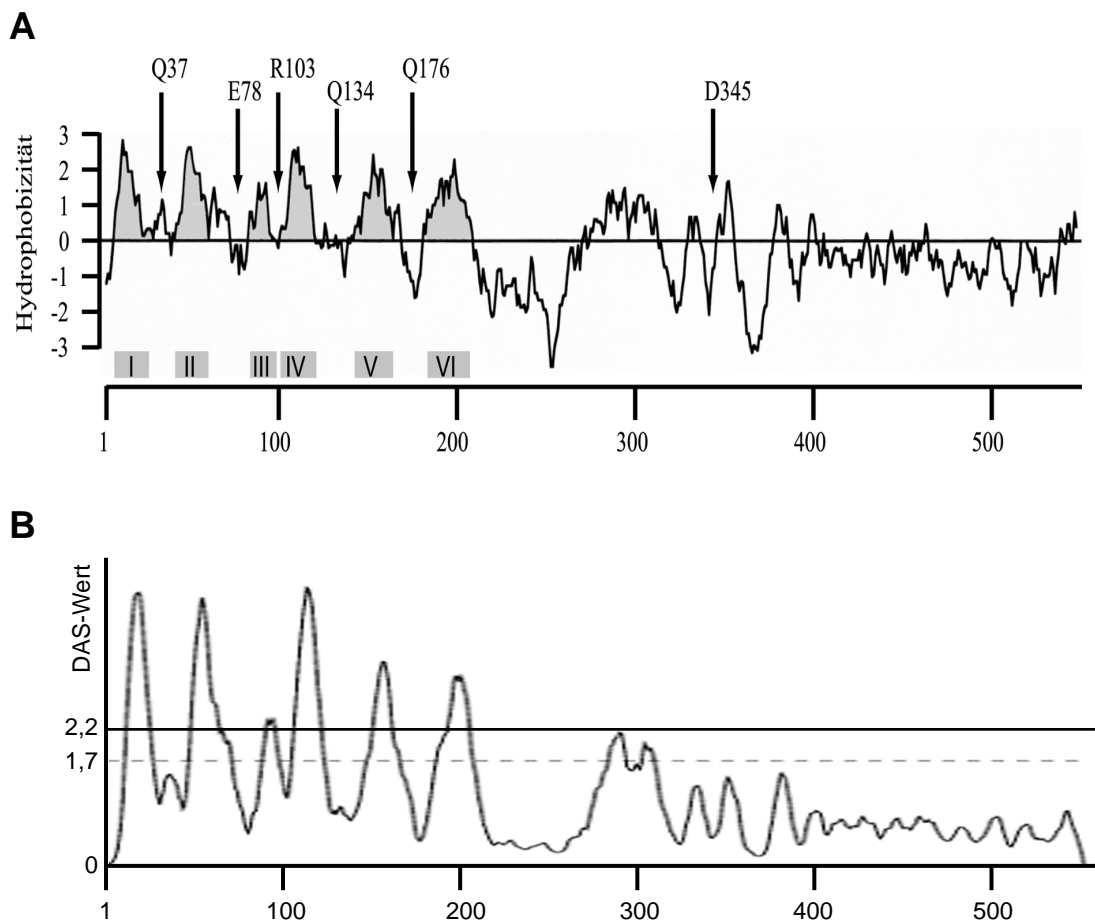


Abb. 3-6: Das Hydrophatie-Profil (A) und das DAS-Profil (B) von Der3/Hrd1p.

Hierzu erzeugte ich zunächst das Plasmid pRS315-*DER3* durch Umklonieren des *Bam*HI/*Hind*III-Fragmentes aus dem Plasmid YEp*DER3* in den Klonierungsvektor pRS315 (vgl. Abschnitt 2.1.3). Von diesem Plasmid wurden mittels PCR die benötigten Fragmente des *DER3/HRD1*-Gens einschließlich Promotor amplifiziert. Carboxyterminal wurde eine *Xho*I-Schnittstelle eingefügt, um die Fusion im richtigen Leseraster durchführen zu können. Aus dem Plasmid pR90 (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999), welches die *SUC2-HIS4*-Fusion enthält, wurde ein Fragment des Gens *PMT1* mit den Enzymen *Sac*I und *Xho*I entfernt und an dessen Stelle die entsprechend geschnittenen PCR-Produkte eingesetzt. Dies führte zu den

Plasmiden pQ37, pE78, pR103, pQ134, pQ176 und pD345, die für die entsprechenden Der3-Suc2-His4-Fusionsproteine kodieren (vgl. Abbildung 3-7).

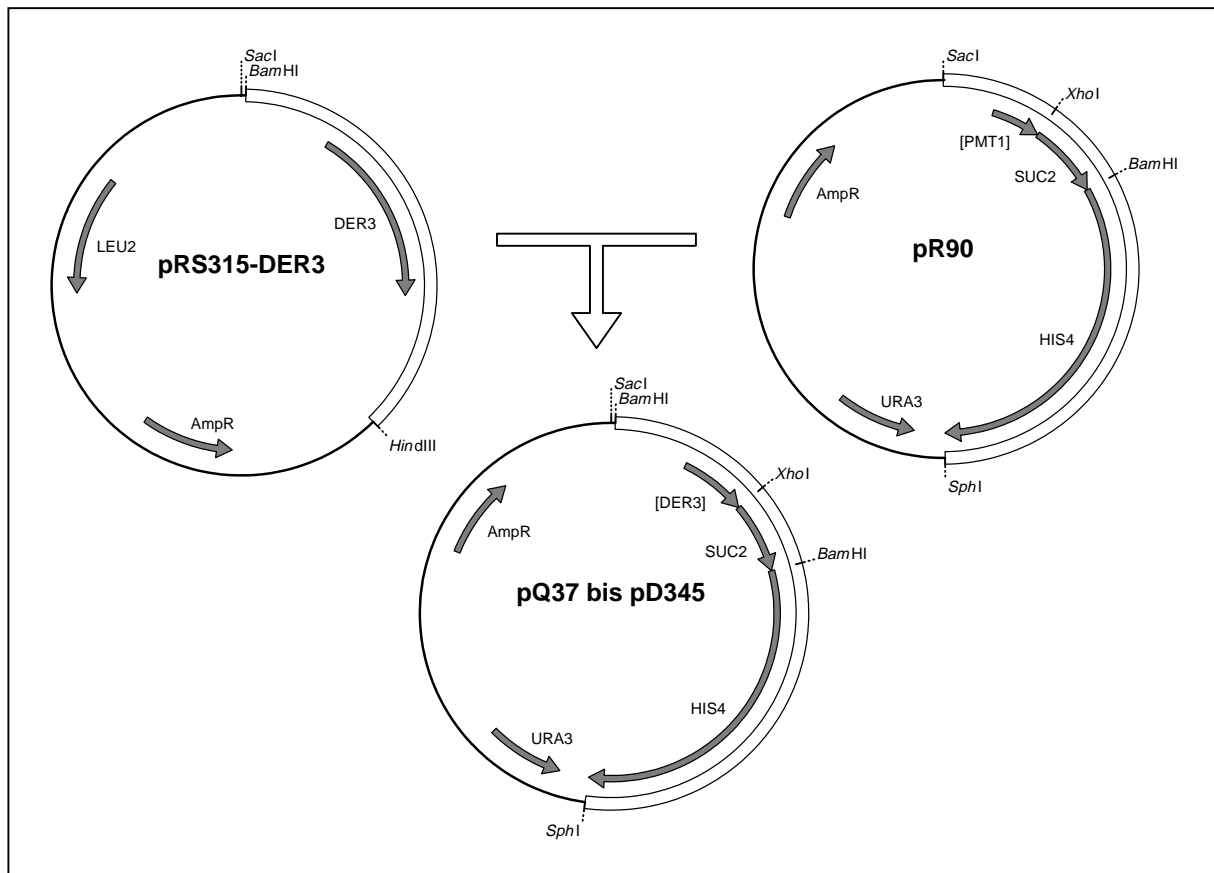


Abb.: 3-7: Klonierungsstrategie für die *DER3-SUC2-HIS4*-Fusionen in den Plasmiden pQ37 bis pD345.

Die sechs Plasmide sowie der leere Kontrollvektor YEp352 wurden in den Hefestamm STY50 transformiert, der die *his4-401* Mutation trägt und bei dem das *SUC2* Gen deletiert ist (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Die resultierenden Stämme exprimieren jeweils eines der in Tabelle 3-1 aufgelisteten Der3-Suc2-His4-Fusionsproteine.

Tabelle 3-1: Die untersuchten *Der3-Suc2-His4*-Fusionsproteine und deren berechnete molekulare Massen.

Bezeichnung des Fusionsproteins	Molekulargewicht
Der3 ^{Q37}	126,4 kDa
Der3 ^{E78}	131,1 kDa
Der3 ^{R103}	134,2 kDa
Der3 ^{Q134}	138,0 kDa
Der3 ^{Q176}	142,8 kDa
Der3 ^{D345}	162,5 kDa

Um die Orientierung des Reporterproteins in den jeweiligen Stämmen zu bestimmen, führte ich zunächst einen Wachstumstest durch (vgl. Abbildung 3-8). Auf Histidin-haltigem Medium können alle Stämme wachsen, da die Aktivität von His4p in diesem Fall nicht erforderlich ist. Enthält das Medium statt Histidin jedoch nur Histidinol, muss dieses durch die Aktivität von His4p im Zytosol zu Histidin umgesetzt werden. Nur die Stämme mit den Fusionsproteinen Der3^{E78}, Der3^{Q134} und Der3^{D345} zeigen Wachstum auf Histidinol-Platten. In diesen Stämmen muss His4p also offensichtlich im Zytosol lokalisiert sein.

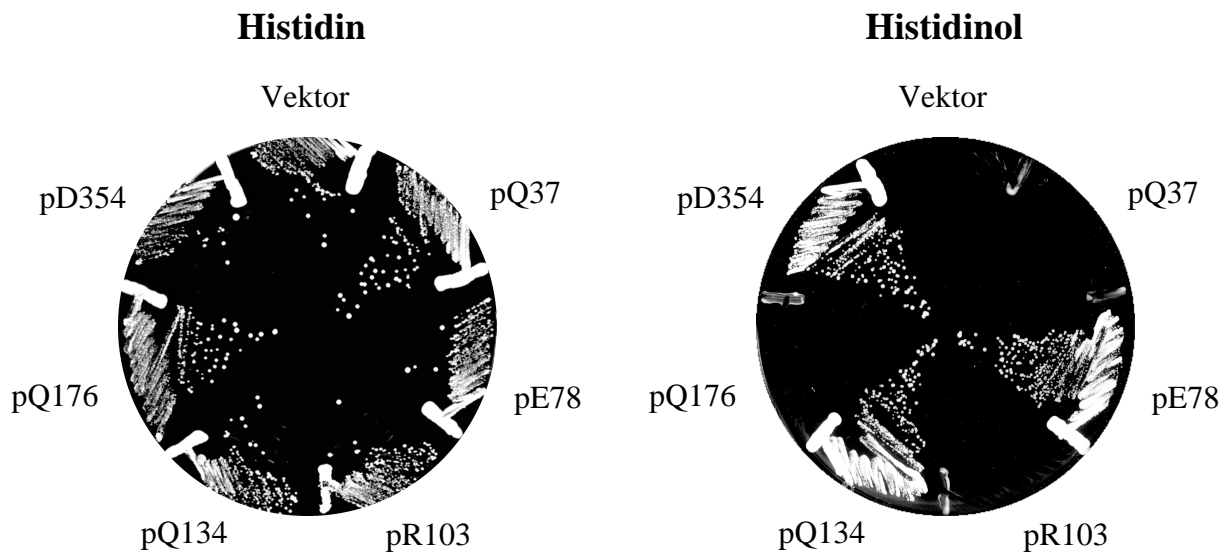


Abb. 3-8: Wachstumstest der Stämme mit den Der3-Suc2-His4-Fusionsproteinen auf Histidin- bzw. Histidinol-haltigem Medium.

Zum weiteren Nachweis für die Topologie der Fusionsproteine untersuchte ich deren Glykosylierungs-Status. Bei ER-luminaler Orientierung sollte sich das Molekulargewicht der Fusionen durch intensive Glykosylierung des Suc2-Fragments um etwa 35 kDa erhöhen.

Zellen der jeweiligen Hefestämme wurden lysiert und die Fusionsproteine mit gegen Suc2p gerichteten Antikörpern präzipitiert. Die Ansätze wurden halbiert und jeweils eine Hälfte mit Endoglykosidase H (Endo H) behandelt, einem Enzym, das unspezifisch Oligosaccharide von Proteinen abspaltet. Anschließend wurden die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels anti-Suc2p-Antikörpern sichtbar gemacht (vgl. Abbildung 3-9).

Bei drei der Fusionsproteine, Der3^{Q37}, Der3^{R103} und Der3^{Q176}, ist eine deutliche Verringerung des Molekulargewichts nach Behandlung mit Endoglykosidase H zu beobachten. Dies zeigt, dass diese Proteine glykosyliert sind. Die deglykosylierten Formen weisen jeweils, wie die Proteine Der3^{E78}, Der3^{Q134} und Der3^{D345}, ihr berechnetes Molekulargewicht auf.

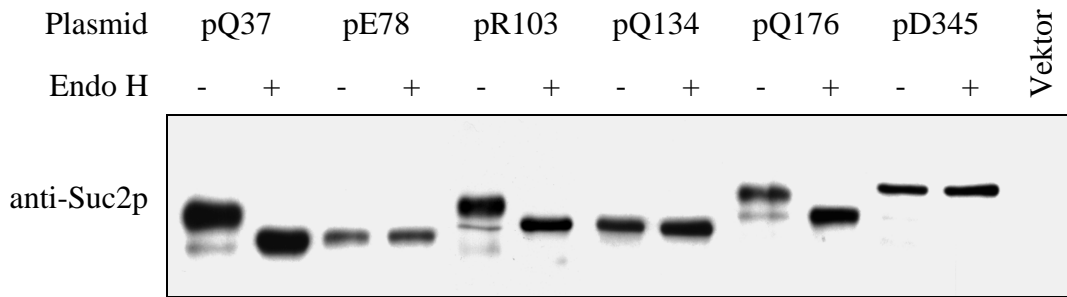


Abb. 3-9: Deglykosylierung und Western-Blot-Analyse der Der3-Suc2-His4-Fusionsproteine.

Dieses Ergebnis ist absolut konsistent mit dem Wachstumsverhalten der Stämme: Diejenigen Fusionsproteine, die Wachstum auf Histidinol ermöglichen, weisen keine Glykosylierung auf, und alle glykosylierten Proteine führen zu einem negativen Wachstumsphänotyp.

Das Konstrukt Der3^{D345}, das sämtliche potentiellen Transmembrandomänen beinhaltet, ermöglicht Wachstum auf Histidinol und ist nicht glykosyliert. Dies bestätigt den mit dem Protein Der3-G erhaltenen Befund, dass sich der hydrophile, carboxyterminale Bereich von Der3/Hrd1p im Zytosol befindet.

Alle übrigen Konstrukte, bei denen das enthaltene Der3-Fragment um jeweils eine potentielle Membrandomäne verkürzt ist, zeigen bezüglich Wachstum und Glykosylierung ein alternierendes Verhalten. Demnach sind alle sechs in Abbildung 3-6 gekennzeichneten Bereiche echte Transmembrandomänen. Insbesondere wird durch das Konstrukt Der3^{R103} gezeigt, dass es sich bei den Bereichen III und IV um zwei getrennte Membrandomänen handelt, die durch einen sehr kurzen hydrophilen Bereich von drei bis vier Aminosäuren verbunden sind.

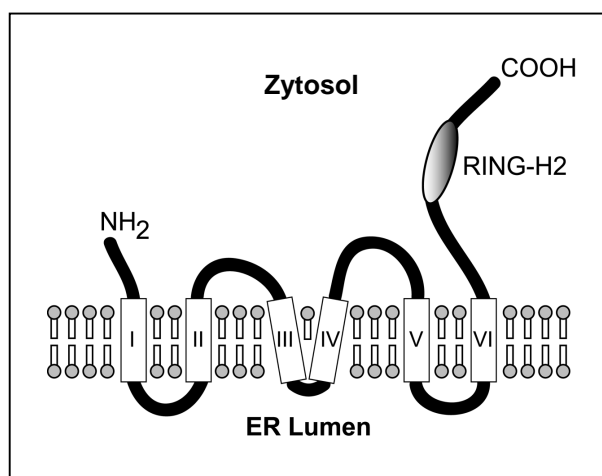


Abb. 3-10: Membrantopologie von Der3/Hrd1p.

Das aus dieser Studie resultierende topologische Modell des Proteins Der3/Hrd1p ist in Abbildung 3-10 dargestellt. Es hat sechs Transmembrandomänen und beide Termini sind zytosolisch. Dieses Modell erklärt auch das Fehlen einer N-Glykosylierung im nativen Der3/Hrd1p trotz des Vorhandenseins entsprechender Konsensussequenzen: Die beiden potentiellen Erkennungssequenzen befinden sich in einer Membrandomäne (Asn 58) bzw. im Zytosol (Asn 137).

3.1.4 Bestimmung der Orientierung des Aminoterminus von Der3/Hrd1p

Das Verhalten des ersten Fusionsproteins (Der3^{Q37}), kein Wachstum auf Histidinol und intensive Glykosylierung, lässt auf die zytosolische Orientierung des Aminoterminus von Der3/Hrd1p schließen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der ersten Membrandomäne - trotz fehlender Homologien - um eine ER-Signalsequenz handelt, die nach ihrer Insertion in die Membran abgeschnitten wird. In diesem Fall hätte das native, reife Der3/Hrd1p nur fünf Transmembrandomänen und einen ER-luminalen Aminoterminus. Das Fusionsprotein Der3^{Q37} wäre dann ein lösliches, lumenales Protein.

Es musste also gezeigt werden, dass Der3^{Q37} ein Membranprotein ist und keine proteolytische Spaltung nach der Membrandomäne erfolgt. Hierzu führte ich ein Membranextraktions-Experiment durch.

Isolierte Membranvesikel aus dem Stamm, der Der3^{Q37} exprimiert, wurden parallel in Puffer, Natriumcarbonat, Harnstoff bzw. Triton-X-100 inkubiert. Anschließend wurden die Membranen (M) durch Zentrifugation vom Überstand (Ü) getrennt und beide Fraktionen einer Western-Blot-Analyse mit anti-Suc2p-Antikörpern unterworfen (vgl. Abbildung 3-11).

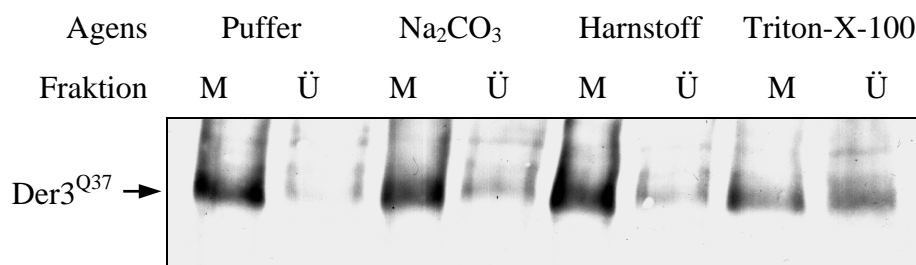


Abb. 3-11: Versuch zur Membranextraktion von Der3^{Q37}.

Bei Verwendung relativ milder Denaturierungs-Agenzien wie Natriumcarbonat oder Harnstoff verblieb der überwiegende Anteil des Proteins in der Membranfraktion. Nur durch das starke Detergenz Triton-X-100 konnte Der3^{Q37} zu etwa 50% aus der Membran herausgelöst und im Überstand detektiert werden.

Die starke Membranassoziation von Der3^{Q37} zeigt, dass es sich bei dem darin enthaltenen hydrophoben Bereich um eine echte Transmembrandomäne handelt. Das native Der3/Hrd1p hat demnach, wie bereits oben postuliert, sechs Transmembrandomänen und einen zytosolischen Aminoterminus.

3.2 Die Funktion von Der3/Hrd1p als E3-Enzym

3.2.1 Der3/Hrd1p-Abhängigkeit der Ubiquitylierung von CPY*

Während mit den Proteinen Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p bereits drei am ER-Abbau beteiligte E2-Enzyme bekannt sind, wurde bislang kein E3-Enzym, das für die Ubiquitylierung von ERAD-Substraten verantwortlich ist, identifiziert.

Da das RING-Finger-Motiv bei einer ganzen Klasse von E3-Enzymen angetroffen wird, ist das Protein Der3/Hrd1p ein potentieller Kandidat für diese Funktion. Diese Möglichkeit wird nun auch durch die in dieser Arbeit gezeigte Tatsache gestützt, dass der carboxyterminale Bereich mit der RING-Finger-Domäne im Zytosol lokalisiert ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst untersucht, inwiefern die Aktivität von Der3/Hrd1p mit der Ubiquitylierung des Substrats CPY* korreliert.

In Zellen, die eine mutierte Form von Der3/Hrd1p exprimieren, bei der der letzte Cysteinrest des RING-Finger-Motivs gegen Serin ausgetauscht ist (Allel *der3-C399S*), ist der Abbau von CPY* blockiert. Um die Funktion von Der3/Hrd1p innerhalb des retrograden Transport- und Abbauweges einzugrenzen, ist die Frage entscheidend, ob in diesem Fall eine Ubiquitylierung der akkumulierten CPY* stattfindet.

Hierzu exprimierte ich in *DER3/HRD1* bzw. *der3-C399S* Zellen, die zusätzlich das *prc1-1* Allel tragen, eine Variante von Ubiquitin, an deren Aminoterminus sich ein HA-Epitop befindet (HA-Ub). Dieses Epitop beeinflusst die biologische Aktivität des Ubiquitin-Moleküls nicht, erlaubt aber eine immunologische Detektion von Ubiquitin-Konjugaten (Hochstrasser *et al.*, 1991). In dem verwendeten Expressionsplasmid befindet sich HA-Ub unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors, der durch Cu²⁺-Ionen aktiviert wird.

Die Zellen wurden in Gegenwart bzw. als Kontrolle in Abwesenheit von Kupfersulfat inkubiert und aufgeschlossen, dann wurde eine Immunopräzipitation mit gegen CPY gerichteten Antikörpern durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und HA-Ub-CPY*-Konjugate durch Western-Blot-Analyse mit anti-HA-Antikörpern sichtbar gemacht. Als Kontrolle für die Effizienz der Immunopräzipitation wurde der Western-Blot anschließend mit anti-CPY-Antikörpern angefärbt (vgl. Abbildung 3-12).

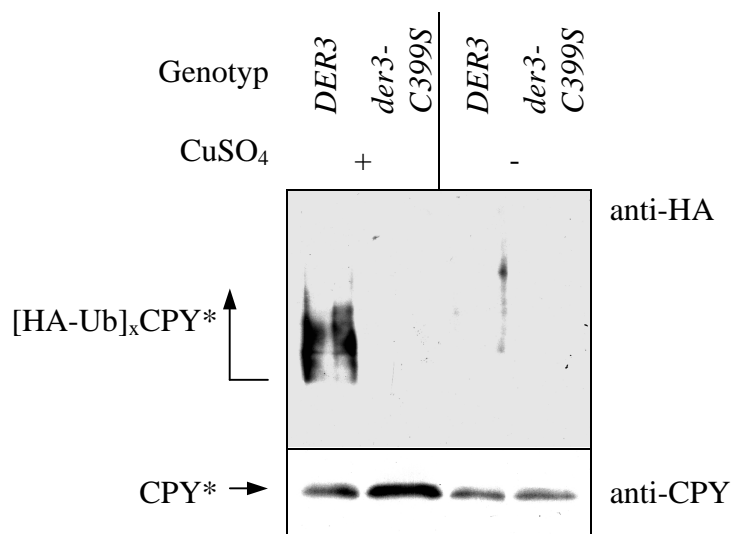


Abb. 3-12: Immunopräzipitation polyubiquitylierter CPY*.

Höhermolekulare, polyubiquitylierte Formen von CPY* ([HA-Ub]_xCPY*) sind nur im *DER3/HRD1* Wildtyp-Stamm bei induzierter Expression von HA-Ub detektierbar. In dem Stamm, der das Protein Der3-C399S mit dem mutierten RING-Finger-Motiv exprimiert, fehlen die entsprechenden Banden hingegen vollständig.

Die Funktionalität der RING-Finger-Domäne von Der3/Hrd1p ist demnach eine Voraussetzung für die Ubiquitylierung von Substraten des ER-Degradationssystems.

3.2.2 Autoubiquitylierung von Der3/Hrd1p

Die Fähigkeit zur Selbstubiquitylierung bei Abwesenheit eines natürlichen Substrates wird bei verschiedenen E3-Enzymen beobachtet. Um Der3/Hrd1p in Bezug auf diese Eigenschaft in einem zellfreien System untersuchen zu können, bediente ich mich einer Fusion des Proteins mit Glutathion-S-Transferase (GST). GST-Fusionsproteine können in *Escherichia coli* exprimiert und durch die Bindung von GST an eine Glutathion-Matrix isoliert werden.

Komponenten enthielt: ATP, Ubiquitin, sowie jeweils ein kommerziell erhältliches E1- und E2-Enzym. Als Kontrolle wurde derselbe Ansatz auch ohne Fusionsprotein bzw. ohne E1 und E2 durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die GST-Fusionen wiederum durch Zugabe von Glutathion-Sepharose präzipitiert und einer Western-Blot-Analyse mit anti-Ubiquitin-Antikörpern unterzogen, um ubiquitylierte Spezies nachzuweisen. Die Mengen an eingesetztem und präzipitiertem Fusionsprotein wurden mittels anti-Der3p-Antikörper überprüft (vgl. Abbildung 3-14).

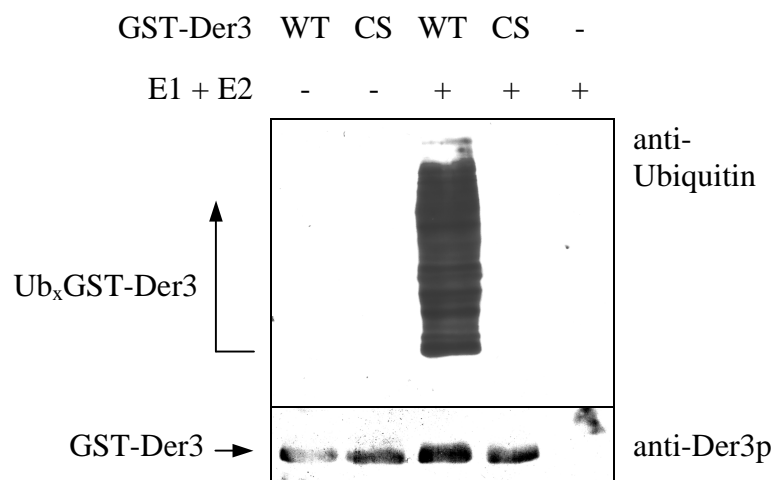


Abb. 3-14: *In vitro* Autoubiquitylierung von GST-Der3.

Der Western-Blot zeigt deutlich eine intensive Bildung von Ubiquitinkonjugaten an dem Protein GST-Der3 (Ub_xGST-Der3), nicht aber an der mutierten Form GST-Der3CS, bei Anwesenheit von E1 und E2. Die Ansätze ohne Fusionsprotein sowie ohne E1- und E2-Enzym enthalten keinerlei polyubiquityliertes Material.

Dieser Befund demonstriert klar die Fähigkeit von Der3/Hrd1p, in Abhängigkeit von E1 und E2 seine eigene Ubiquitylierung zu katalysieren. Entscheidend für diese Aktivität ist die Integrität des RING-Finger-Motivs.

3.3 Interaktion von Der3/Hrd1p mit E2-Enzymen

3.3.1 Interaktionsstudien mit GST-Der3-Fusionsproteinen

Für mehrere RING-E3-Enzyme wurde eine direkte Wechselwirkung mit dem korrespondierenden E2-Enzym nachgewiesen (vgl. Abschnitt 1.3.2). Um zu prüfen, ob eine solche Interaktion auch zwischen Der3/Hrd1p und einem oder mehreren der am ER-Abbau beteiligten E2-Enzyme Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p auftritt, führte ich Interaktionsstudien mit dem GST-Der3 Fusionsprotein durch.

Zunächst betrachtete ich Ubc7p, dessen Fehlen den stärksten stabilisierenden Effekt auf den Abbau von CPY* hat. Ubc7p ist ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Um es immunologisch detektieren zu können, exprimierte ich eine funktionelle Variante von Ubc7p mit einem aminoterminalen myc-Epitop von einem centromerischen Plasmid in einem Wildtyp-Hefestamm (Biederer *et al.*, 1997). Ein nativer Proteinextrakt dieses Stammes wurde mit dem an Glutathion-Sepharose gebundenen Fusionsprotein GST-Der3 bzw. GST-Der3CS sowie als Negativkontrolle mit reinem GST inkubiert. Nach dem Pelletieren der Sepharose wurde diese mit Natriumchlorid-haltigem Puffer gewaschen, um schwach gebundene Proteine zu entfernen. Die Proteine aus dem Überstand (Ü) und der Waschlösung (W) wurden mit TCA präzipitiert, die an der Sepharose gebundenen Proteine wurden mittels Harnstoff und SDS eluiert (E). Die drei Fraktionen sowie der Hefe-Zellextrakt als Positivkontrolle wurden elektrophoretisch aufgetrennt und myc-Ubc7p durch anti-myc-Antikörper in der Western-Blot-Analyse sichtbar gemacht (vgl. Abbildung 3-15).

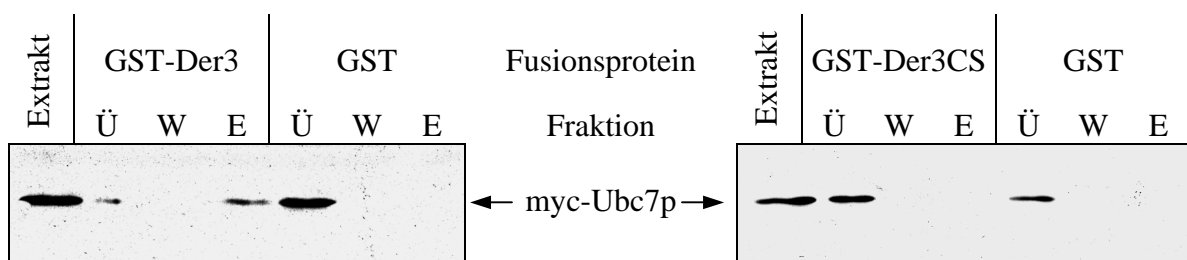


Abb. 3-15: GST-Interaktionsstudie zwischen GST-Der3 und Ubc7p.

Im linken Teil der Abbildung ist das Bindungsverhalten von GST-Der3 im Vergleich zu reinem GST dargestellt. Der überwiegende Anteil von myc-Ubc7p befindet sich bei GST-Der3 in der Eluat-Fraktion, während bei der Kontrolle „GST“ sämtliches myc-Ubc7p im

Überstand verbleibt. Der hydrophile Teil von Der3/Hrd1p wechselwirkt also spezifisch mit myc-Ubc7p und vermag dieses aus der Lösung zu präzipitieren.

Der rechte Teil der Abbildung zeigt dasselbe Experiment unter Verwendung der mutierten Form GST-Der3CS an Stelle des Wildtyp-Proteins, das zu einem völlig anderen Ergebnis führt: In diesem Fall tritt keine Interaktion auf und myc-Ubc7p ist, wie bei reinem GST, nur im Überstand anzutreffen. Auch die Bindungsfähigkeit von Der3/Hrd1p an Ubc7p ist demnach von der Funktionalität der RING-Finger-Domäne abhängig.

Das ebenfalls lösliche E2-Enzym Ubc1p mit einem Molekulargewicht von 24 kDa ist auch an der Ubiquitylierung von CPY* beteiligt. Um eine mögliche Wechselwirkung mit Der3/Hrd1p zu testen, führte ich mit diesem Protein ebenfalls eine GST-Interaktionsstudie, wie oben beschrieben, durch. Dank der Verfügbarkeit eines entsprechenden Antikörpers konnte ich hierzu von einem Zellextrakt normaler Wildtypzellen ausgehen, die Ubc1p chromosomal exprimieren (vgl. Abbildung 3-16).

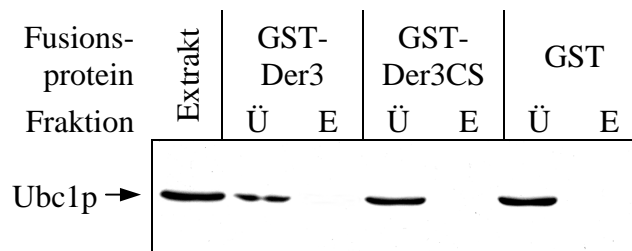


Abb. 3-16: GST-Interaktionsstudie zwischen GST-Der3 und Ubc1p.

Im Gegensatz zu Ubc7p kann zwischen Ubc1p und Der3/Hrd1p keine Wechselwirkung nachgewiesen werden. Weder die Wildtyp-Form GST-Der3, noch die mutierte Form GST-Der3CS oder GST alleine können Ubc1p präzipitieren, welches sich in allen drei Ansätzen ausschließlich im Überstand befindet.

Das dritte am ERAD-System beteiligte E2-Enzym ist Ubc6p, ein Protein von 28 kDa. Es ist über eine Membrandomäne unmittelbar am Carboxyterminus in der ER-Membran verankert. Da GST-Interaktionsstudien mit partiell hydrophoben Proteinen kaum durchzuführen sind, weil sie die Löslichkeit des zu präzipitierenden Proteins voraussetzen, exprimierte ich eine um die Transmembrandomäne verkürzte Form von Ubc6p (Ubc6TM) von einem 2 μ -Plasmid (Sommer und Jentsch, 1993).

Mit Proteinextrakt von einem entsprechenden Hefestamm führte ich wiederum das oben beschriebene GST-Interaktions-Experiment durch, wobei das Protein Ubc6TM mit anti-Ubc6p-Antikörpern in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3-17).

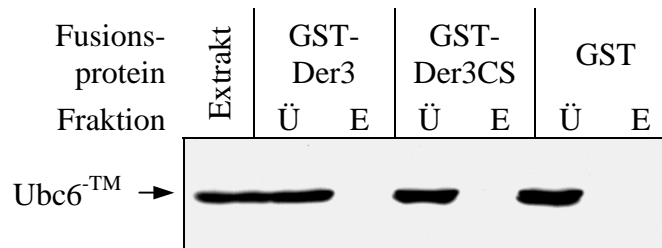


Abb. 3-17: GST-Interaktionsstudie zwischen GST-Der3 und Ubc6p.

Wie bei Ubc1p, fällt das Ergebnis auch für Ubc6TM negativ aus. Das Fusionsprotein GST-Der3 interagiert mit Ubc6TM ebenso wenig wie GST-Der3CS oder GST.

3.3.2 Studien mit dem Split-Ubiquitin-System

Das Split-Ubiquitin-System erlaubt die Messung der lokalen Konzentration eines Proteins in der Umgebung eines anderen Proteins *in vivo* und ist insbesondere für Membranproteine gut geeignet. Eine sehr hohe lokale Konzentration kann auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine hindeuten (Johnsson und Varshavsky, 1994; Stagljar *et al.*, 1998).

Das System beruht auf der Tatsache, dass die beiden getrennt exprimierten Hälften des Ubiquitin-Moleküls, N_{ub} und C_{ub}, bei entsprechender räumlicher Nähe rekombinieren können und von Ubiquitin-spezifischen Proteasen als natives Ubiquitin erkannt werden. N_{ub} wird an den zytosolischen Aminoterminus eines der zu untersuchenden Proteine fusioniert, C_{ub} an den zytosolischen Carboxyterminus des anderen Proteins, gefolgt von einem Argininrest (R) und dem Ura3-Protein. Ura3p katalysiert die Umsetzung von 5-Fluoro-orotsäure (5-FOA) zu dem zytotoxischen Produkt 5-Fluoro-uracil. Solange N_{ub} und C_{ub} nicht interagieren, führt die Aktivität von Ura3p somit zur Sensitivität der Zellen gegen 5-FOA. Die Rekombination der beiden Ubiquitin-Hälften führt zur Spaltung zwischen C_{ub} und dem Arginin durch Ubiquitin-spezifische Proteasen. Das freigesetzte Ura3p mit dem ungeschützten Argininrest am Aminoterminus ist ein Substrat des als „N-end-rule pathway“ bezeichneten proteasomalen Abbauweges und wird mit einer Halbwertszeit von ca. 3 min abgebaut (Varshavsky, 1996). Dies führt zur Resistenz der Zellen gegen 5-FOA (vgl. Abbildung 3-18).

Das Wachstum der entsprechenden Zellen auf 5-FOA-Medium ist somit ein Maß für die räumliche Nähe oder lokale Konzentration der beiden untersuchten Proteine. Allerdings haben auch N_{ub} und C_{ub} selbst eine starke Affinität zueinander. Um daher das System sensitiver und differenzierter zu machen, können parallel verschiedene Varianten von N_{ub} eingesetzt werden: neben der Wildtyp-Form (N_{uI}) eine Mutante mit einem I13A-Austausch (N_{uA}), die eine geringere Affinität gegenüber C_{ub} aufweist, und eine I13G-Mutante mit noch geringerer Affinität (N_{uG}) (Wittke *et al.*, 1999).

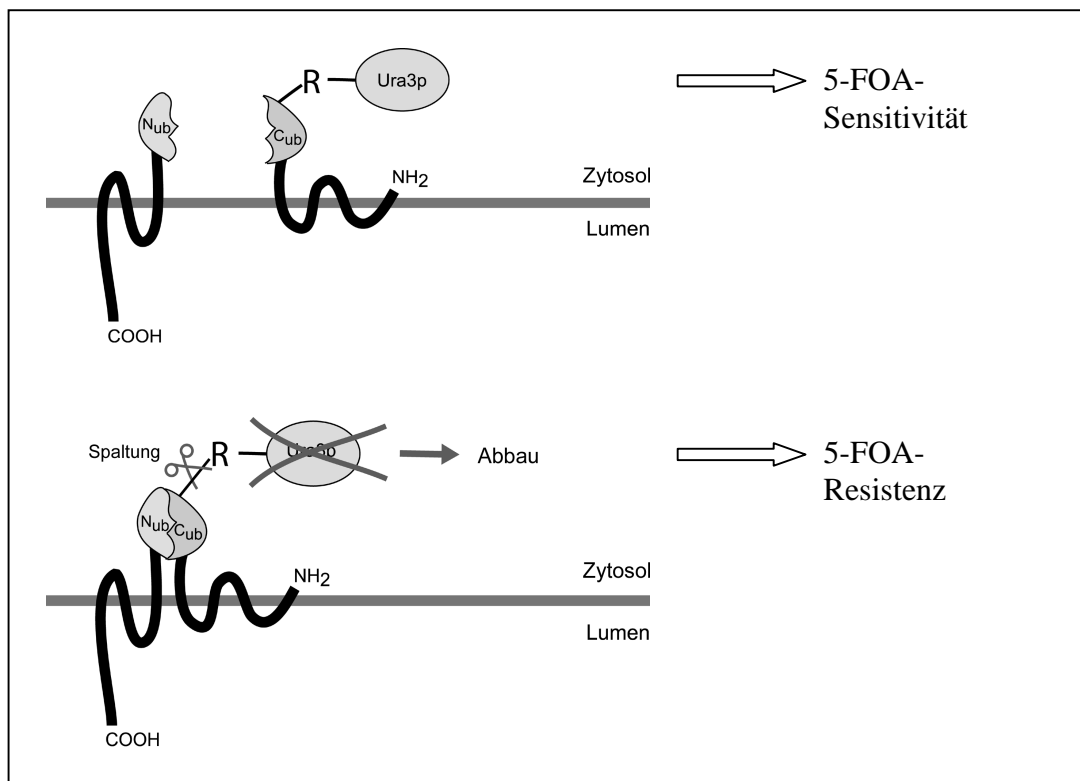


Abb. 3-18: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Split-Ubiquitin-Systems.

Um die mit der Der3-GST-Fusion beobachtete *in-vitro*-Interaktion zwischen Der3/Hrd1p und Ubc7p auch *in vivo* zu überprüfen, fusionierte ich das C_{ub} -R-Ura3-Reporterprotein an den zytosolischen Carboxyterminus von Der3/Hrd1p. Hierzu ging ich von dem Plasmid pRS305-*SEC63-CUB* (Wittke *et al.*, 1999) aus und ersetzte das darin enthaltene *SEC63*-Fragment durch ein carboxyterminales PCR-Fragment von *DER3/HRD1* (ca. 540 bp) mittels der Schnittstellen *EagI* und *SalI*. Das resultierende Plasmid pRS305-*DER3-CUB* wurde mit *BglII* inmitten des *DER3/HRD1*-Fragments linearisiert und in den Hefestamm JD53 (Wittke *et al.*, 1999) transformiert. Durch homologe Rekombination erhielt ich den Hefestamm YPD42, der das Fusionsprotein Der3- C_{ub} -R-Ura3 chromosomal exprimiert (vgl. Abbildung 3-19).

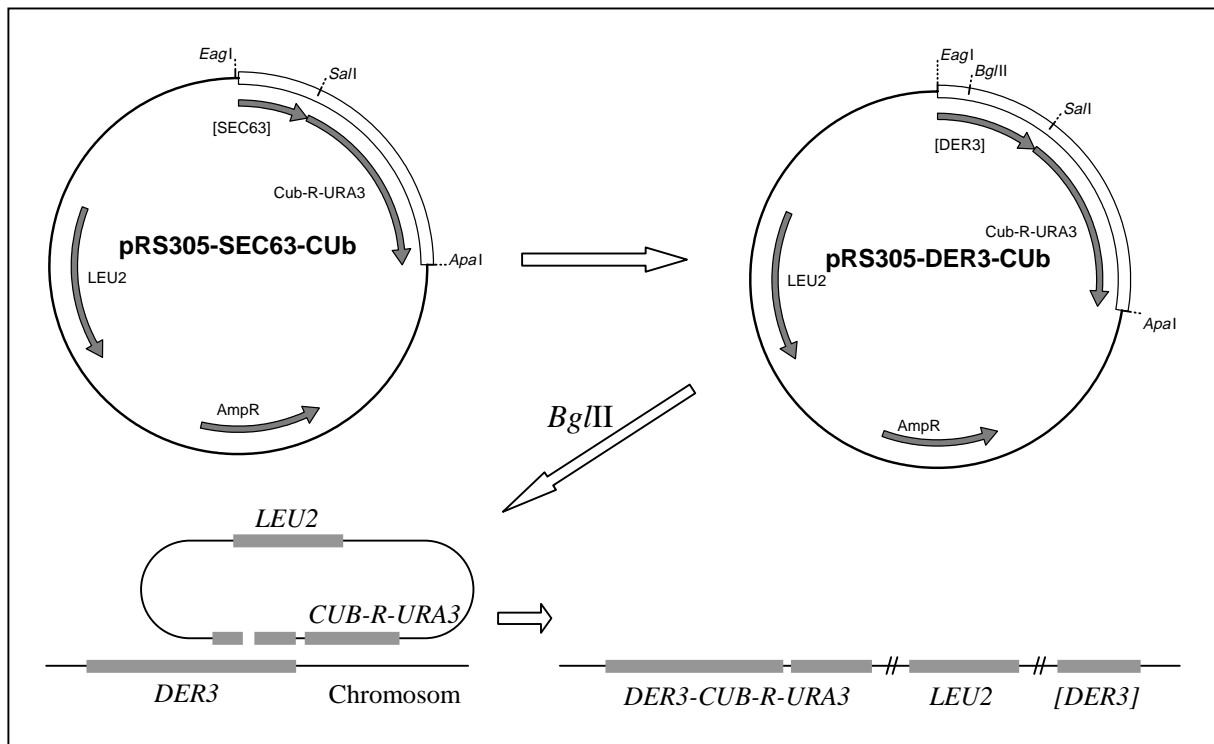


Abb. 3-19: Herstellung des Plasmids pRS305-DER3-CUB und dessen chromosomale Integration.

Weiterhin erzeugte ich Fusionen von N_{ul} , N_{uA} bzw. N_{uG} am Aminoterminus von Ubc7p, indem ich das *Bam*HI/*Eco*RI-Fragment in den Vektoren pRS314- N_{ux} -*SED5* (Wittke *et al.*, 1999) durch das mittels PCR amplifizierte *UBC7*-Gen ersetzte, wobei N_{ux} jeweils für *NUI*, *NUA* und *NUG* steht. Die resultierenden Plasmide pRS314- N_{ux} -*UBC7* ermöglichten die Expression von N_{ux} -Ubc7 unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors (vgl. Abbildung 3-20). Entsprechende Fusionsproteine mit N_{ux} am zytosolischen Aminoterminus von Ubc6p wurden von den Plasmiden pRS314- N_{ux} -*UBC6*, ebenfalls unter dem *CUP1*-Promotor, exprimiert (N. Johnsson, Köln).

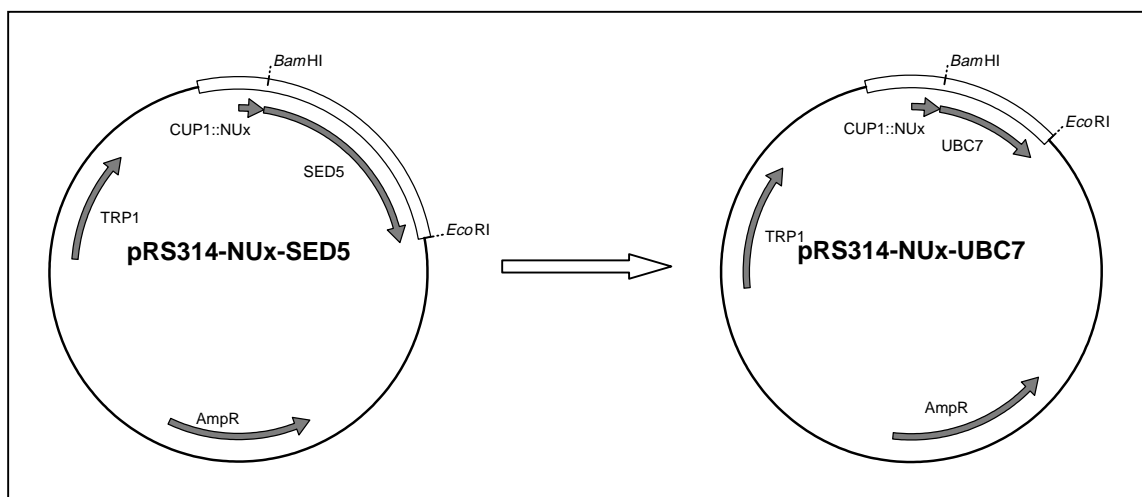


Abb. 3-20: Herstellung der Plasmide pRS314-*NUI-UBC7*, pRS314-*NUA-UBC7* und pRS314-*NUG-UBC7*.

Die Plasmide pRS314-*NUx-UBC6* und pRS314-*NUx-UBC7* wurden jeweils in den Stamm YPD42 (s.o.) transformiert. Mit den erhaltenen Zellen wurde ein Wachstumstest auf 5-FOA-Platten durchgeführt (vgl. Abbildung 3-21).

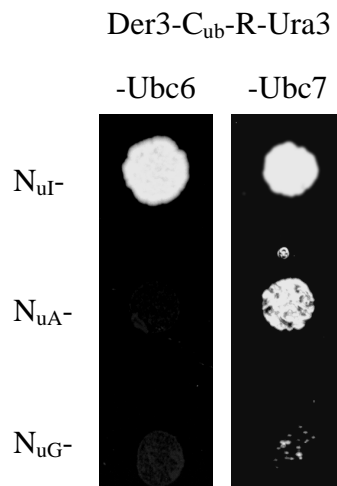


Abb. 3-21: Split-Ubiquitin-Studie mit Der3-C_{ub} und N_{ux}-Ubc6 bzw. N_{ux}-Ubc7.

Während im Fall von Ubc6p nur die Ubiquitin-Form mit der höchsten Affinität, N_{uI}-Ubc6, zu einem Wachstum der Zellen führt, zeigt bei Ubc7p auch das Konstrukt N_{uA}-Ubc7 einen deutlichen Effekt und sogar N_{uG}-Ubc7 induziert ein geringes Wachstum.

Dies deutet auf eine höhere Konzentration von Ubc7p als von Ubc6p in der Umgebung von Der3/Hrd1p in der Zelle hin, was mit dem *in vitro* gewonnenen Ergebnis übereinstimmt, dass GST-Der3 zwar mit Ubc7p, nicht aber mit Ubc6p interagiert (vgl. Abschnitt 3.3.1).

3.4 Interaktionen zwischen Der3/Hrd1p, Hrd3p und Sec61p

3.4.1 Wechselwirkung zwischen Der3/Hrd1p und Hrd3p

Das ER-Membranprotein Hrd3p ist wie Der3/Hrd1p eine essentielle Komponente des ERAD-Systems. Darüberhinaus zeigt es eine starke genetische Interaktion mit Der3/Hrd1p: In Abwesenheit von Hrd3p wird Der3/Hrd1p mit einer Halbwertszeit von ca. 7 min abgebaut (Plemper *et al.*, 1999a) (vgl. Abschnitt 1.4.3). Mit dem Split-Ubiquitin-System testete ich Der3/Hrd1p im Hinblick auf eine mögliche physikalische Interaktion mit Hrd3p.

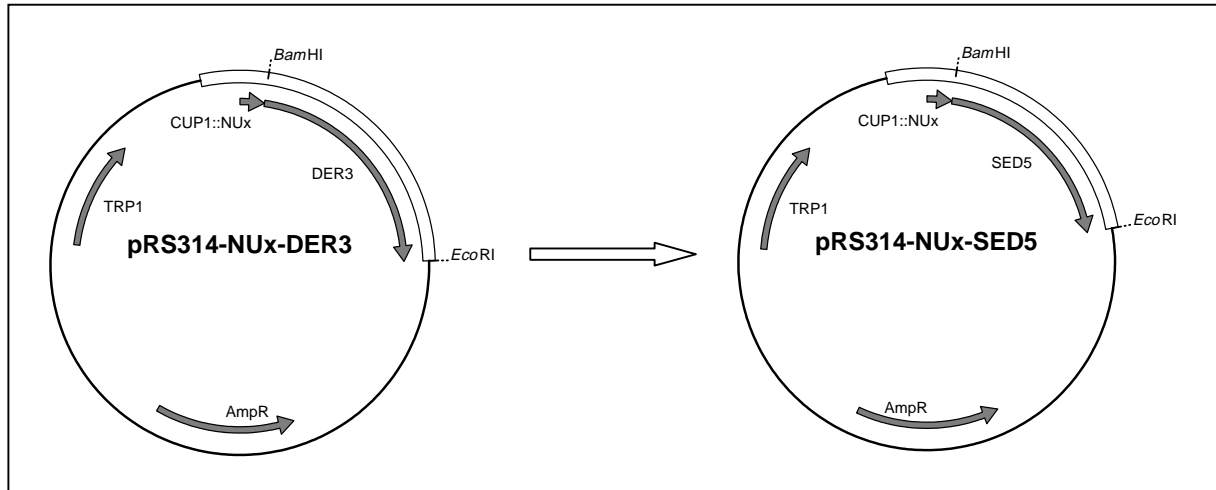


Abb. 3-23: Herstellung der Plasmide **pRS314-NU_I-DER3**, **pRS314-NU_A-DER3** und **pRS314-NU_G-DER3**.

Die Plasmide **pRS314-NU_x-DER3** sowie **pRS314-NU_x-SED5** wurden in den Stamm YPD41 (s.o.) transformiert und die resultierenden Zellen einem Wachstumstest auf 5-FOA-haltigem Medium unterzogen (vgl. Abbildung 3-24).

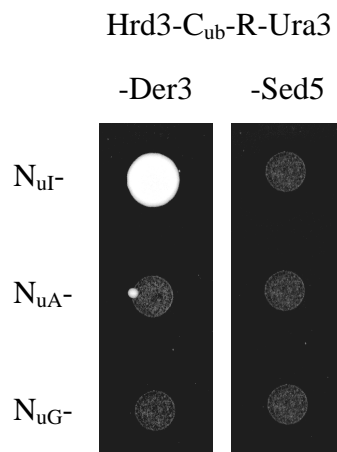


Abb. 3-24: Split-Ubiquitin-Studie mit Hrd3-C_{ub} und N_{ux}-Der3 bzw. N_{ux}-Sed5.

Nur N_{uI}-Der3 ermöglicht ein Wachstum der Zellen, und zeigt somit eine Wechselwirkung mit Hrd3-C_{ub}-R-Ura3, nicht aber N_{uA}- und N_{uG}-Der3. Eine direkte Wechselwirkung oder Komplexbildung von Der3/Hrd1p und Hrd3p lässt sich aus diesem Ergebnis zwar nicht ableiten, es bestätigt jedoch eindeutig die zytosolische Orientierung des Aminoterminus von Der3/Hrd1p und zeigt, dass eine Interaktion von Der3/Hrd1p und Hrd3p sterisch zumindest möglich ist. Das als Kontrolle verwendete Protein Sed5p ist im Golgi-Apparat lokalisiert und zeigt daher mit keinem der drei N_{ux}-Varianten einen Effekt.

3.4.2 Wechselwirkung zwischen Der3/Hrd1p bzw. Hrd3p und Sec61p

Die Instabilität von Der3/Hrd1p in $\Delta hrd3$ Zellen wird durch das gleichzeitige Vorhandensein des *sec61-2* Allels kuriert. Dieser Befund führte zu Spekulationen über eine mögliche Komplexbildung des Sec61-Kanals mit Hrd3p oder Der3/Hrd1p oder beiden Proteinen unter Ausbildung des sog. Retrotranslokons (Plemper *et al.*, 1999a) (vgl. Abschnitt 1.4.3).

Um diese Hypothese auf biochemischer Ebene zu überprüfen, führte ich Split-Ubiquitin-Studien mit den Fusionsproteinen Der3-C_{ub}-R-Ura3 und Hrd3-C_{ub}-R-Ura3 durch. Diese testete ich in Kombination mit N_{ux}-Fusionen von Sec61 sowie den drei weiteren Proteinen Sec22, Sec62 und Ssh1 als Kontrollen.

N_{ux}-Sec22 und N_{ux}-Sec62 wurden von den Plasmiden pRS314-*NUx-SEC22* bzw. pRS314-*NUx-SEC62* exprimiert (Wittke *et al.*, 1999), die ich in die Stämme YPD41 und YPD42 transformierte (s.o.). N_{ux}-Sec61 und N_{ux}-Ssh1 wurden in den Stämmen NJY61-x bzw. NJY78-x chromosomal exprimiert (Wittke *et al.*, 1999). In diese Stämme integrierte ich die Plasmide pRS305-*DER3-CUB* bzw. pRS305-*HRD3-CUB* chromosomal und erhielt dadurch die Stämme YPD48 bis YPD59 (vgl. Abschnitt 2.1.1). Das Wachstumsverhalten der beschriebenen Stämme auf 5-FOA-Platten ist in Abbildung 3-25 dargestellt.

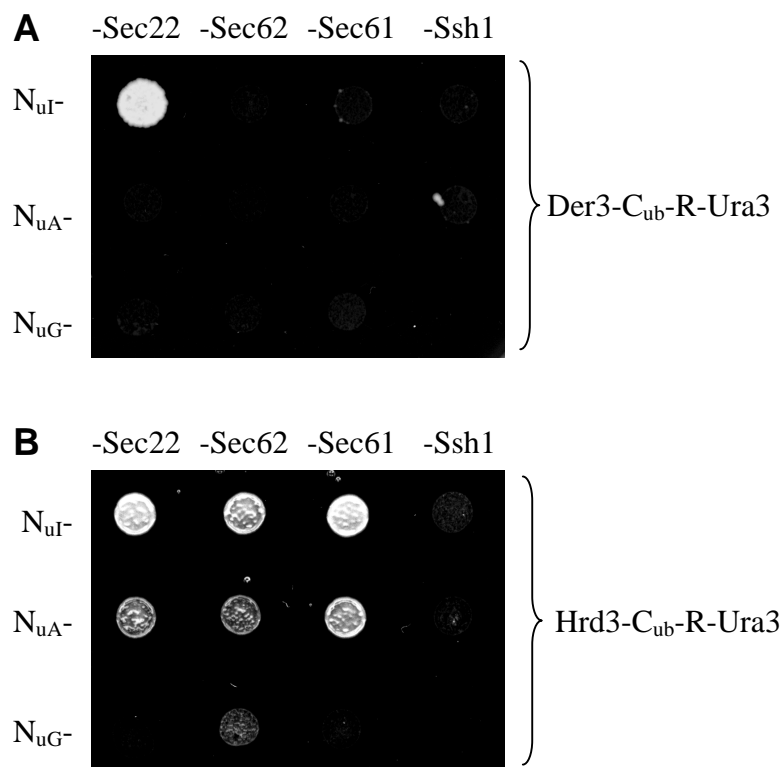


Abb. 3-25: Split-Ubiquitin-Studie mit Der3-C_{ub} (A) bzw. Hrd3-C_{ub} (B) und N_{ux}-Sec22, -Sec62, -Sec61 bzw. -Ssh1.



Sec22p ist ein sog. v-SNARE Protein, das die Fusion von Transportvesikeln zwischen dem ER und dem Golgi mit der jeweiligen Zielmembran katalysiert (Spang und Schekman, 1998). Sec62p ist eine Komponente des aus Sec62p, Sec63p, Sec71 und Sec72p bestehenden tetrameren Komplexes, der bei der posttranslatorischen Translokation zusätzlich zum Sec61-Komplex benötigt wird (vgl. Abschnitt 1.2.1). Am ERAD-System ist Sec62p jedoch nicht beteiligt (Plempner *et al.*, 1997). Das Protein Ssh1p ist homolog zu Sec61p und kann wie dieses in Assoziation mit Sbh2p und Sss1p ein „alternatives“ Translokon bilden, welches, nur beim cotranslatorischen Import, den Transport von ca. 25% der naszierenden Proteine übernimmt (Prinz *et al.*, 2000).

Der3-C_{ub}-R-Ura3 zeigt keinerlei Wechselwirkung mit N_{ux}-Sec61, -Sec62 und -Ssh1. Lediglich in Kombination mit N_{uA}-Sec22 ergibt sich ein Wachstumseffekt, der in Anbetracht der Funktion beider Proteine nicht zu erwarten wäre. Allerdings ist bekannt, dass N_{ux}-Sec22 häufig zu unspezifischen Wechselwirkungen mit verschiedenen ER-Proteinen neigt (N. Johnsson, Köln, persönliche Mitteilung). Eine Interaktion zwischen Der3/Hrd1p und Sec61p wird durch die Split-Ubiquitin-Studie in jedem Fall nicht unterstützt.

Hrd3-C_{ub}-R-Ura3 interagiert relativ stark mit N_{ux}-Sec22, -Sec61 und -Sec62. Die Interaktion mit Sec62p ist dabei etwas stärker als mit Sec61p, da zwar N_{uG}-Sec62, nicht aber N_{uG}-Sec61 zu schwachem Wachstum führt. Mit N_{ux}-Ssh1 tritt dagegen keinerlei Wechselwirkung auf. Während der Effekt von Sec22p wohl auch hier als eher unspezifisch anzusehen ist, könnte die Interaktion mit Sec61p durchaus auf eine hohe Proximität der beiden Proteine hindeuten, vor allem, da das homologe Ssh1p keinen Effekt zeigt. Allerdings zeigt auch Sec62p, das wie Ssh1p nicht am ER-Abbau beteiligt ist, einen recht starken Effekt.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse spielt auch die Frage eine Rolle, ob das Hrd3-C_{ub}-R-Ura3 Fusionsprotein biologisch funktionell und sein Interaktionsverhalten somit als repräsentativ für das native Hrd3p anzusehen ist.

Da sich die C_{ub}-R-Ura3-Fusion sehr nahe an der Membrandomäne von Hrd3p befindet und dadurch deren Struktur evtl. stört, stellte ich eine weitere Fusion her, indem ich zwischen Hrd3p und C_{ub}-R-Ura3 die 44 carboxyterminalen Aminosäuren von Hrd3p nochmals einfügte. Ein unterschiedliches Verhalten der beiden Fusionsproteine könnte über den Einfluss des Abstandes zwischen Membran und C_{ub}-R-Ura3 Aufschluss geben.

Die für die 44 Aminosäuren kodierenden Basenpaare wurden mittels PCR synthetisiert und dabei mit einer *SalI*- am Amino- und einer *XhoI*-Schnittstelle am Carboxyterminus versehen. Dieses Fragment wurde in die *SalI*-Schnittstelle des Plasmids pRS305-*SEC63-CUB* inseriert

und aus dem Produkt wurde das Plasmid pRS305-*HRD3^D-CUB* in gleicher Weise hergestellt wie das Plasmid pRS305-*HRD3-CUB* aus pRS305-*SEC63-CUB* (vgl. Abbildung 3-22).

Die Vektoren pRS305-*HRD3-CUB* und pRS305-*HRD3^D-CUB* wurden mit *Bsa*BI geschnitten und in einen Wildtyp-Stamm, der CPY* exprimiert, transformiert. Die dadurch erhaltenen Hefestämme YPD61 und YPD60 exprimieren chromosomal Hrd3-C_{ub}-R-Ura3 bzw. das entsprechende Protein mit dem duplizierten Aminoterminus, Hrd3^D-C_{ub}-R-Ura3.

Um die Funktionalität der Fusionsproteine zu überprüfen, verglich ich die Abbau-geschwindigkeit von CPY* in einem *HRD3* Wildtyp-Stamm, einem Δ *hrd3* Stamm sowie den Stämmen YPD60 und YPD61.

Die Bestimmung der Abbaukinetik erfolgt durch eine Pulse-Chase-Analyse: Nach einer Präinkubation in schwefelfreiem Medium werden die Zellen 20 min in Gegenwart von radioaktiv markiertem Methionin inkubiert, welches in sämtliche während dieser Zeit synthetisierten Proteine eingebaut wird („Pulse“). Durch Zugabe eines hohen Überschusses an nicht-radioaktivem Methionin wird die Markierung der Proteine gestoppt und die radioaktiven Proteine unterliegen ab diesem Zeitpunkt ihrer jeweiligen Abbaukinetik. Durch Proben-nahmen zu verschiedenen Zeitpunkten („Chase“), Immunopräzipitation von CPY*, elektrophoretische Auftrennung und Erzeugung eines Autoradiogramms können die unterschiedlichen Mengen radioaktiv markierter CPY* auf einem Röntgenfilm optisch dargestellt werden. Zusätzlich können die Proteinmengen mit einem PhosphoImager quantitativ erfasst und ausgewertet werden.

In Abbildung 3-26 ist das Ergebnis der Pulse-Chase-Analyse der oben beschriebenen Hefestämme dargestellt.

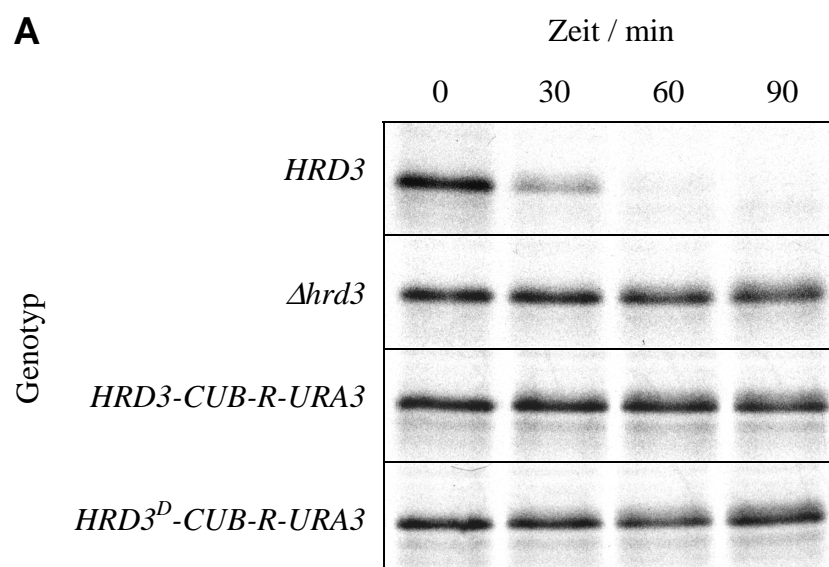


Abb. 3-26: (A) Autoradiogramm der Pulse-Chase-Analyse von CPY*.

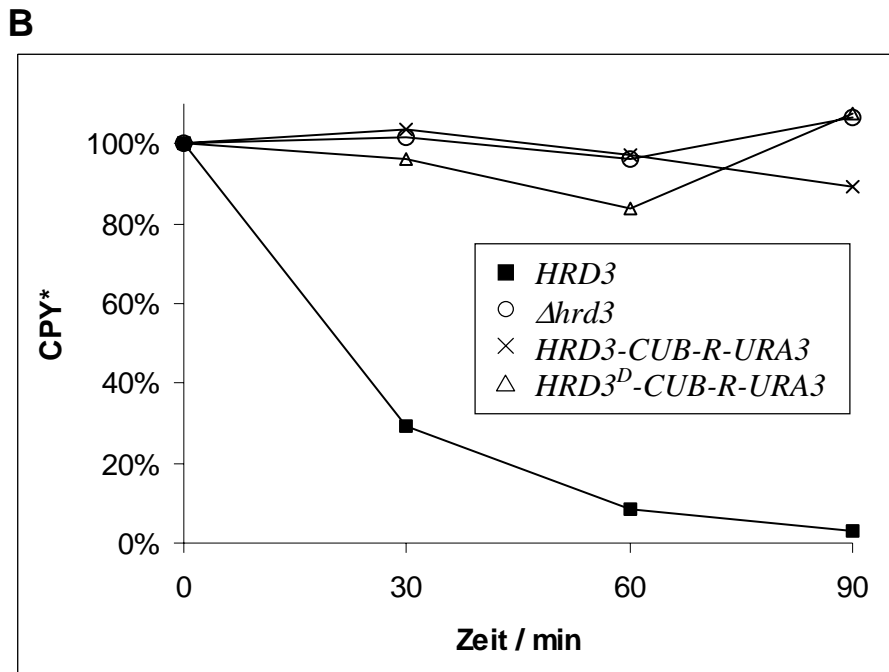


Abb. 3-26: (B) Quantifizierung der Pulse-Chase-Analyse von CPY*.

Das Ergebnis zeigt deutlich, dass sowohl Hrd3-C_{ub}-R-Ura3 als auch Hrd3^D-C_{ub}-R-Ura3 völlig infunktionell sind. In beiden Stämmen ist CPY* über einen Zeitraum von 90 min, wie im *Δhrd3* Deletionsstamm, völlig stabil. Nur Wildtyp-Hrd3p unterstützt den Abbau von CPY* mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min.

Das Vorhandensein von C_{ub}-R-Ura3 am Carboxyterminus von Hrd3p beeinflusst die Struktur des Moleküls offensichtlich derart, dass es seine Rolle im ERAD-System nicht mehr erfüllen kann. Dies gilt auch, wenn der Abstand zwischen den beiden Proteinen etwas vergrößert ist.

Auf Grund dieser Tatsache muss davon ausgegangen werden, dass auch das Interaktionsverhalten von Hrd3p gegenüber anderen Proteinen durch die C_{ub}-R-Ura3 Fusion durchaus verändert oder gestört sein kann.

3.5 Beteiligung zytosolischer Chaperone am ERAD-System

3.5.1 Die Hsp70-Proteine der Hefe

Die Familie der Hitze-Schock-Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 70 kDa (Hsp70) stellt eine der wichtigsten Klassen molekularer Chaperone dar. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung ungefalteter Polypeptidketten während deren

Synthese, Translokation in das ER oder das Mitochondrium sowie deren Rückfaltung nach Denaturierung durch Hitze oder andere Umwelteinflüsse (Craig *et al.*, 1993).

Als einheitliche Nomenklatur werden für die Hsp70 von *S. cerevisiae* die Genbezeichnungen *SSA*, *SSB*, *SSC* und *SSD* verwendet. Neben den mitochondrialen *Ssc1p/Ssc2p* und dem ER-Chaperon *Kar2p* (*Ssd1p*) umfasst die Familie die sechs zytosolischen Chaperone *Ssa1p-Ssa4p* und *Ssb1p/Ssb2p* (vgl. Abbildung 3-27). Das ER-lumenale *Lhs1p* sowie die zytosolischen Proteine *Sse1p* und *Sse2p* weisen eine entfernte Verwandtschaft zur Hsp70-Familie auf (Rassow *et al.*, 1997).

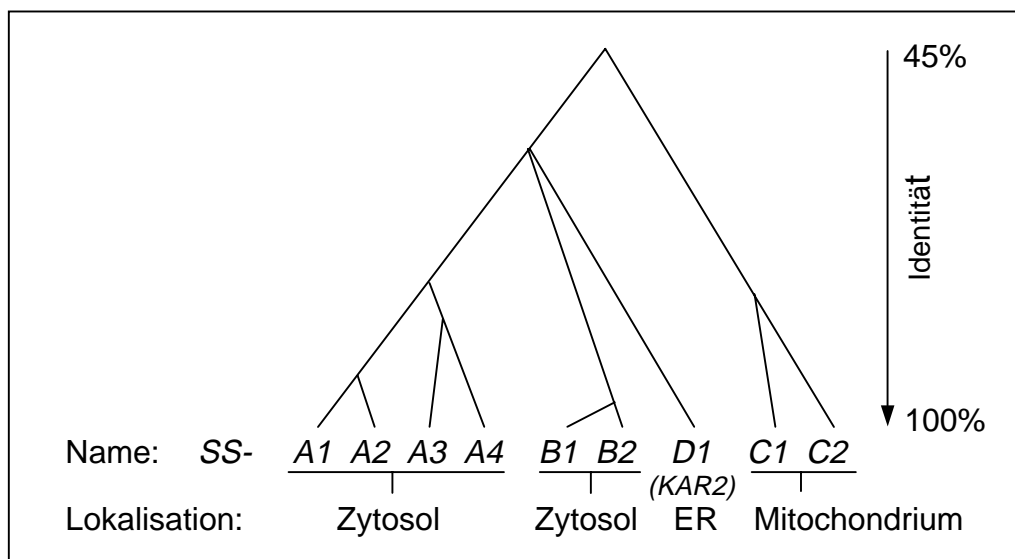


Abb. 3-27: Die Proteine der Hsp70-Familie von *S. cerevisiae* (aus Craig *et al.*, 1993).

Während *Ssb1p* und *Ssb2p* überwiegend mit Ribosomen assoziiert und somit für die Bindung naszierender Polypeptide verantwortlich sind (Nelson *et al.*, 1992), besteht eine der Hauptaufgaben der *Ssa*-Proteine in der Unterstützung des Imports von Proteinen in das ER (McClellan und Brodsky, 2000). Die vier Proteine, die untereinander eine Identität von 80 bis 97% aufweisen, sind funktionell stark redundant. Dies kommt in der Tatsache zum Ausdruck, dass bis zu drei der entsprechenden Gene, ohne einen dramatischen Phänotyp zu erzeugen, deletiert werden können, das Vorhandensein mindestens eines der vier *Ssa*-Chaperone jedoch essentiell ist (Becker *et al.*, 1996).

3.5.2 ER-Abbau von CPY* in *ssa*-Mutanten

Da die Substrate des ERAD-Systems den Translokationskanal in entfaltetem Zustand verlassen müssen, ist vorstellbar, dass die zytosolischen *Ssa*-Proteine bei deren Export aus dem ER eine vergleichbare Rolle übernehmen wie *Kar2p* während dem Importprozess (vgl. Abschnitte 1.2.2 und 1.4.3).

Ich überprüfte diese Möglichkeit mit Hilfe von zwei Hefemutanten, bei denen die Gene *SSA2*, *SSA3* und *SSA4* vollständig deletiert sind (Becker *et al.*, 1996). Das Gen *SSA1* liegt bei einem der Stämme als Wildtyp-Allel vor, während der andere Stamm das temperatursensitive Allel *ssa1-45* trägt. Zellen dieses Stammes stellen ihr Wachstum kurz nach Erhöhung der Temperatur auf 37 °C auf Grund der Inaktivierung von *Ssa1-45p*, und somit der Defizienz aller vier Chaperone, ein. Dabei handelt es sich um einen zytostatischen Phänotyp, da die Zellen selbst nach mehreren Tagen bei 37 °C ihr Wachstum wieder aufnehmen, wenn die Temperatur auf 30 °C gesenkt wird (Becker *et al.*, 1996).

Um das Substratmolekül CPY* in diesen Stämmen sowie dem korrespondierenden Wildtyp-Stamm exprimieren zu können, führte ich einen Genaustausch durch homologe Rekombination durch. Das integrative Plasmid *bMK150* (Knop *et al.*, 1996a), welches das chromosomale *ClaI/HindIII*-Fragment des *prc1-1* Allels enthält, wurde an der *BglII*-Schnittstelle innerhalb der kodierenden Sequenz linearisiert und in die betreffenden Hefestämme transformiert (vgl. Abbildung 3-28).

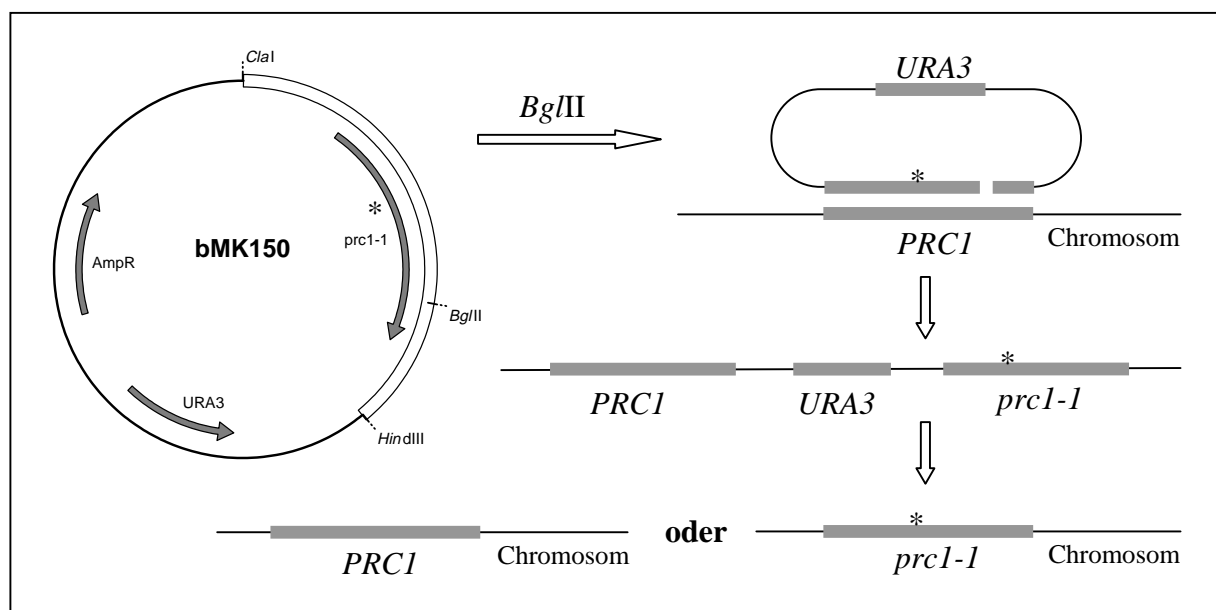


Abb. 3-28: Genaustausch durch homologe Rekombination: Austausch des Allels *PRC1* durch *prc1-1*.

Chromosomale Integration des Plasmids führte zu Zellen, die sowohl das Wildtyp-Gen *PRC1* als auch das Allel *prc1-1* enthielten. Durch Selektion auf Verlust des in dem Plasmid enthaltenen *URA3*-Markers mittels 5-FOA-Medium erhielt ich Zellen, die eines der beiden Allele wieder verloren hatten. Die gewünschten Zellen mit dem *prc1-1* Allel konnten schließlich durch einen qualitativen CPY-Aktivitätstest leicht identifiziert werden.

In den auf diese Weise hergestellten Stämmen bestimmte ich quantitativ die Abbau-Geschwindigkeit von CPY* durch eine Pulse-Chase-Analyse (vgl. Abschnitt 3.4.2). Das Experiment wurde bei der für den *ssa1-45* Stamm restriktiven Temperatur von 37 °C durchgeführt, um eine Situation betrachten zu können, in der keines der Ssa-Proteine aktiv ist (vgl. Abbildung 3-29).

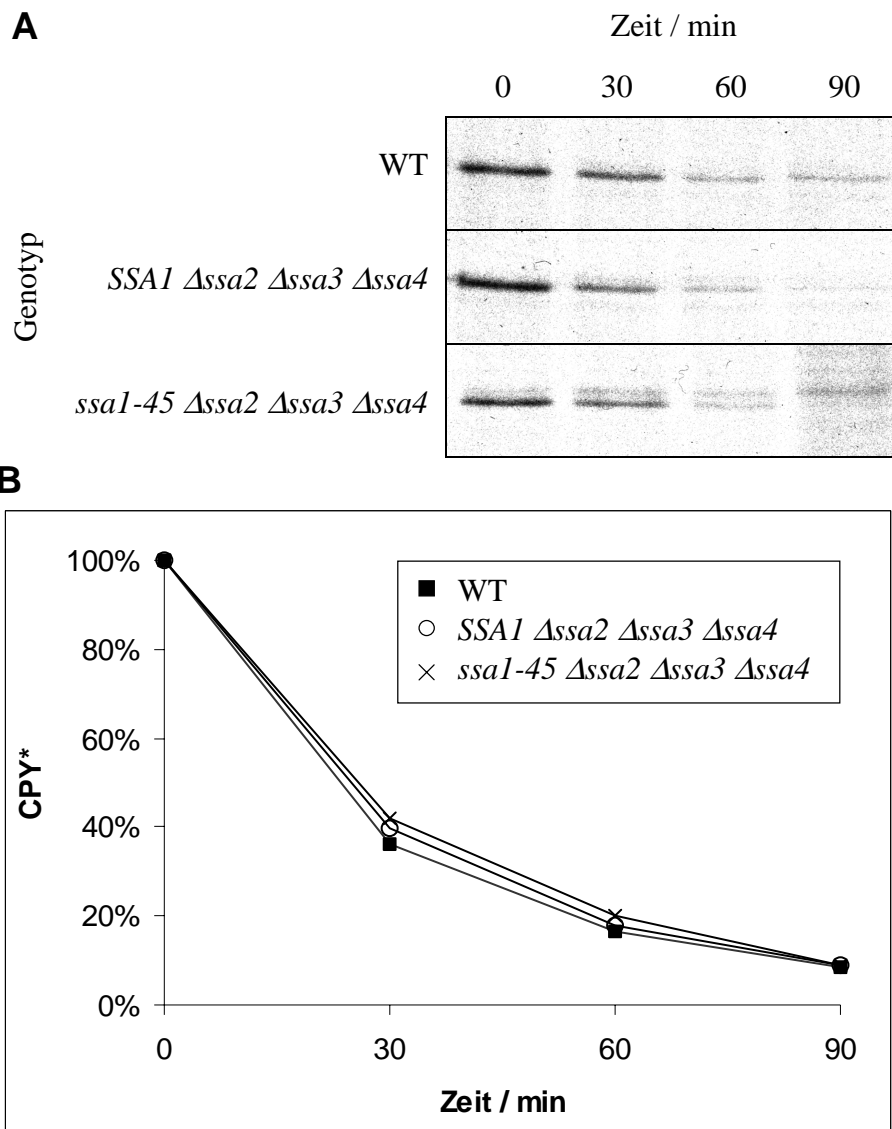


Abb. 3-29: Autoradiogramm (A) und Quantifizierung (B) der Pulse-Chase-Analyse der *ssa*-Mutanten.

Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Abbaukinetik von CPY* in allen drei Stämmen völlig identisch ist. Offensichtlich ist für den Abbau der CPY* keines der cytosolischen Ssa-Chaperone notwendig.

3.5.3 Die Co-Faktoren der Hsp70-Proteine

Das Hsp70 stabilisiert ungefaltete Polypeptide, indem es in wiederholten Zyklen mit ihnen assoziiert und wieder dissoziiert. Für die Hydrolyse von ATP, die die treibende Kraft für diesen Vorgang darstellt, ist die Wechselwirkung des Chaperons mit einem Co-Chaperon, einem sog. DnaJ-Homolog, notwendig (Pilon und Schekman, 1999; Rassow *et al.*, 1997). Im ER sind dies die Co-Faktoren Sec63p, Scj1p und Jem1p, die mit Kar2p interagieren (vgl. Abschnitt 1.2.2). Das DnaJ-Homolog für die zytosolischen Hsp70-Chaperone ist Ydj1p, ein essentielles Protein mit einer molekularen Masse von 45 kDa, das mit einem Farnesyl-Rest an der Aminosäure Serin 406 modifiziert ist (Caplan *et al.*, 1992b).

3.5.4 ER-Abbau von CPY* in einer *ydj1*-Mutante

Um eine Beteiligung von Ydj1p am ER-Abbau zu überprüfen, bediente ich mich eines Stammes mit dem temperatursensitiven Allel *ydj1-151*. Bei der restriktiven Temperatur von 37 °C werden in diesem Stamm verschiedene Substrate nicht mehr in das Mitochondrium bzw. in das ER importiert (Caplan *et al.*, 1992a).

Ich ersetzte in diesem Stamm das Allel *PRC1* durch *prc1-1* (s.o.) und führte zusammen mit einem entsprechenden *YDJ1* Wildtyp-Stamm eine Pulse-Chase-Analyse bei 37 °C durch (vgl. Abbildung 3-30).

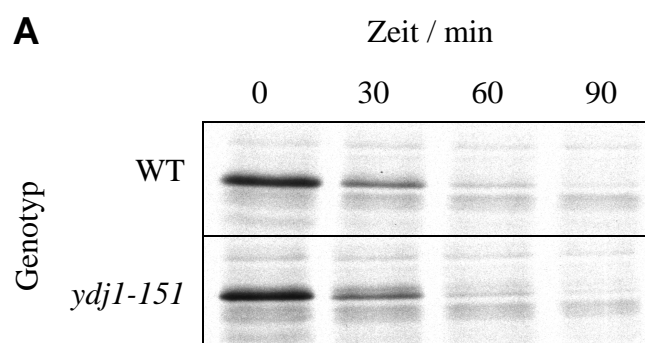


Abb. 3-30: (A) Autoradiogramm der Pulse-Chase-Analyse der *ydj1-151*-Mutante.

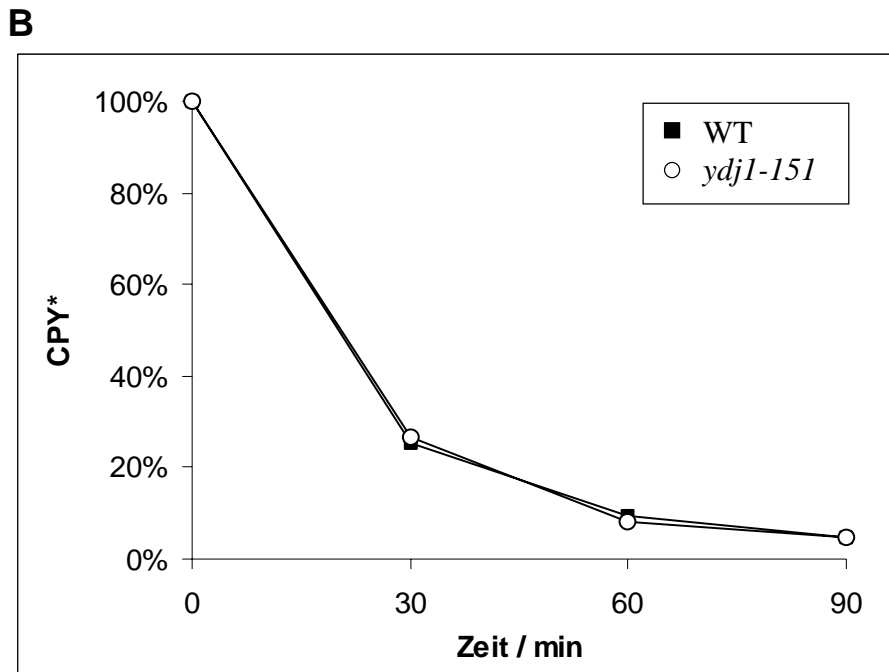


Abb. 3-30: (B) Quantifizierung der Pulse-Chase-Analyse der *ydj1-151*-Mutante.

Wie bereits bei den *SSA*-Mutanten, ist auch in dem *ydj1-151* Stamm kein Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit von CPY* gegenüber dem *YDJ1* Wildtyp-Stamm zu erkennen.

Die zytosolischen Hsp70-Chaperone Ssa1p-Ssa4p und ihr Co-Faktor Ydj1p werden für den retrograden Transport von CPY* aus dem ER sowie deren Degradation nicht benötigt.

3.6 Beteiligung von UbA-Proteinen am ERAD-System

3.6.1 Die UbA-Domänen-Proteine Rad23p, Dsk2p und Rpn10p

Die Hefe-Proteine Rad23p und Dsk2p, deren Aminotermini eine starke Homologie zu Ubiquitin aufweisen (UbL-Domäne), enthalten darüber hinaus sog. UbA-Domänen, die mit Polyubiquitin-Ketten wechselwirken können (vgl. Abschnitt 1.3.3). Dieses Sequenzmotiv, das sich über etwa 50 Aminosäuren erstreckt, befindet sich bei beiden Proteinen am Carboxyterminus, bei Rad23p befindet sich eine weitere UbA-Domäne in der Mitte des Proteins (Jentsch und Pyrowolakis, 2000).

Rad23p, ein lösliches Protein mit 398 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle im zellulären Reparaturmechanismus für beschädigte DNA. Dabei interagiert es über seine UbL-Domäne mit der Untereinheit Rpn10p des 26S-Proteasoms. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der DNA-Reparaturvorgang nicht von der proteolytischen Aktivität des Proteasoms abhängig ist,

wohl aber von der Integrität des regulatorischen 19S-Partikels (Schauber *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1999).

Das Protein Dsk2p scheint funktionell mit Rad23p zu überlappen, da die Deletion beider Gene zu einem temperatursensitiven Phänotyp führt, während die Einzelmutanten bei allen Temperaturen normales Wachstum zeigen. Der Wachstumsdefekt der Doppelmutante beruht auf einer fehlenden Duplikation des Spindelpolkörpers, was darauf hindeutet, dass die beiden Proteine auch in diesen Prozess involviert sind (Biggins *et al.*, 1996).

Auf Grund ihrer Fähigkeit, sowohl mit Polyubiquitin-Ketten als auch mit dem 26S-Proteasom zu interagieren, könnte den UbA-Proteinen als zusätzliche Funktion eine Vermittler-Rolle zwischen dem Proteasom und dessen Substraten zukommen.

Die Untereinheit Rpn10p, die diese Wechselwirkung vermittelt, besitzt selber eine UbA-Domäne und bindet Polyubiquitin-Ketten *in vitro* (van Nocker *et al.*, 1996). Erstaunlicherweise hat die Deletion von *RPN10* als einzige der proteasomalen Untereinheiten jedoch keine Auswirkung auf das Wachstum der Zellen. Rpn10p kann daher nicht der einzige Substrat-Rezeptor des Proteasoms sein. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass eine Substraterkennung bzw. ein Substrattransport über eines oder mehrere der Proteine Rad23p, Dsk2p und Rpn10p bei einem spezialisierten Abbauweg wie dem ERAD-System eine wichtige Rolle spielen.

3.6.2 ER-Abbau von CPY* in *rpn10*-, *rad23*- und *dsk2*-Mutanten

Da keines der oben erwähnten Proteine für die Zelle essentiell ist, konnte ich den Abbau von CPY* in entsprechenden Deletions-Mutanten testen. Hierfür verwendete ich die Deletions-Stämme aus der Stammsammlung der Firma Euroscarf (Frankfurt a. M.), die Hefestämme mit Deletionen aller nicht-essentiellen Gene anbietet (Winzeler *et al.*, 1999).

Ich exprimiere in diesen Stämmen eine Form von CPY* mit einem dreifachen HA-Epitop am Carboxyterminus (CPY*-HA₃) von einem centromerischen Plasmid unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das an CPY* anfusionierte HA-Epitop ist erforderlich, weil sich bei Verwendung von anti-CPY-Antikörpern die in den Euroscarf-Stämmen exprimierte Wildtyp-Form von CPY in der Pulse-Chase-Analyse störend auswirken würde. CPY*-HA₃ wird vom ERAD-System mit denselben Charakteristika abgebaut wie CPY* (C. Taxis, persönliche Mitteilung).

Ich exprimiere CPY*-HA₃ in den Deletions-Stämmen $\Delta rpn10$, $\Delta rad23$ und $\Delta dsk2$ sowie dem isogenen Wildtyp-Stamm und führte eine Pulse-Chase-Analyse mit anti-HA-Antikörpern durch (vgl. Abbildung 3-31).

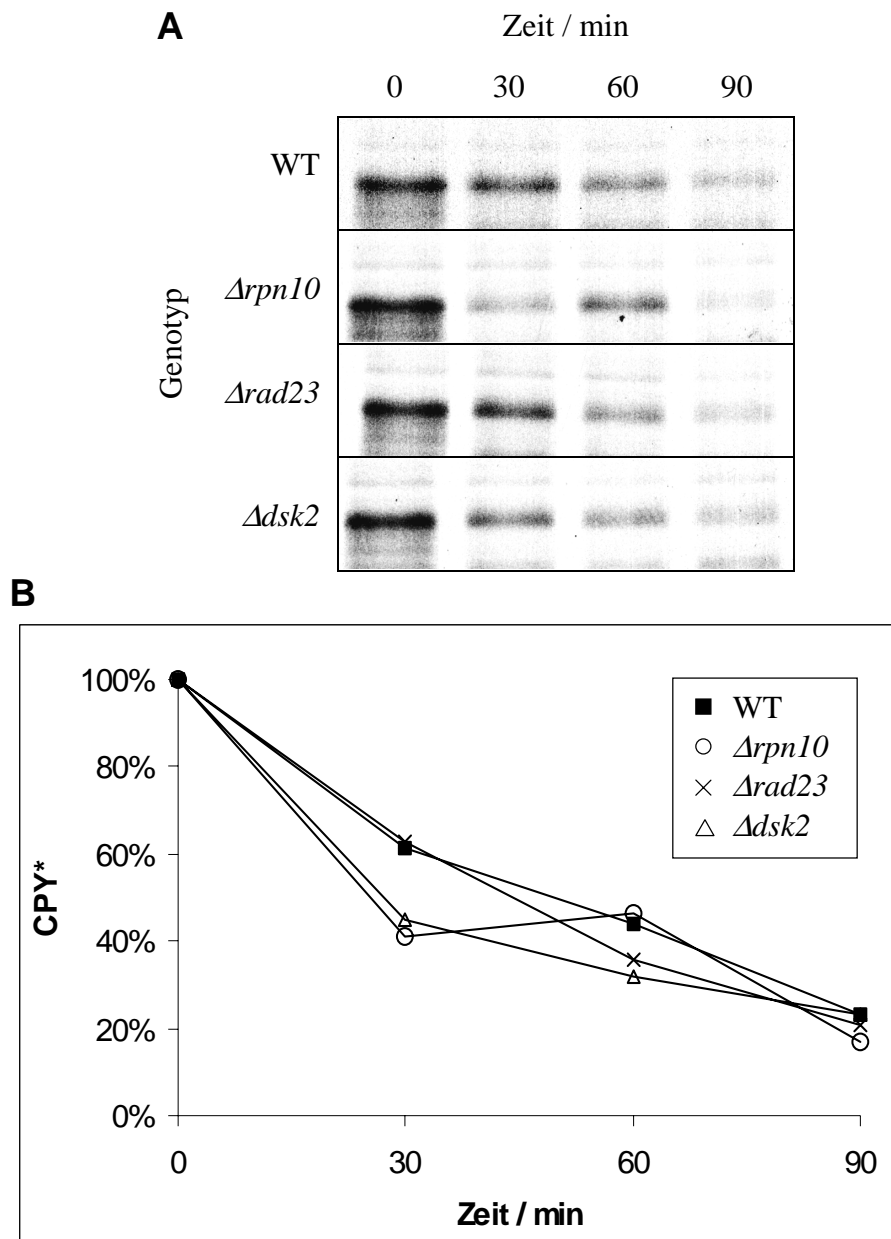


Abb. 3-31: Autoradiogramm (A) und Quantifizierung (B) der Pulse-Chase-Analyse der *rpn10*-, *rad23*- und *dsk2*-Mutanten.

Die drei Mutanten-Stämme zeigen alle eine ähnliche bzw. fast identische Abbaukinetik von CPY*-HA₃ wie der entsprechende Wildtyp-Stamm. Eine Stabilisierung des Substrats oder eine verlangsamte Abbaurate sind in keinem der Stämme zu beobachten.

4 Diskussion

Für die RING-H2-Finger-Domäne im carboxyterminalen Bereich von Der3/Hrd1p war von Bordallo *et al.* (1998) eine Lokalisierung im Lumen des ER vorhergesagt worden. Dieses Ergebnis musste im Hinblick auf neuere Erkenntnisse über die Funktion von RING-Finger-Proteinen als Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme) in Zweifel gezogen werden: eine aktive Rolle des RING-Motivs in der Ubiquitylierungs-Kaskade setzt seine zytosolische Lokalisation voraus.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Topologiebestimmung von Der3/Hrd1p bestätigt diese Vermutung klar. Das Fehlen jeglicher Glykosylierung an einer carboxyterminal eingefügten Akzeptorsequenz spricht bereits stark für eine Abwesenheit dieses Bereichs des Proteins vom ER-Lumen. Allerdings kann dieser negative Befund noch nicht als hinreichender Beweis angesehen werden. So könnte z.B. auch die Tertiärstruktur des Proteins im Bereich des Carboxyterminus eine Glykosylierung im Lumen des ER sterisch verhindern. Durch die Analyse jeder einzelnen Transmembrandomäne von Der3/Hrd1p mittels Fusionen mit dem Suc2-His4-Reporter konnte ich hingegen eindeutig die Anzahl und Orientierung dieser Domänen bestimmen. Sowohl bei lumenaler als auch bei zytosolischer Lokalisation tritt bei Verwendung des Reporters ein messbarer, positiver Effekt in Form von Glykosylierung bzw. Wachstum der Zellen auf. Demnach durchspannt Der3/Hrd1p die ER-Membran sechsmal und beide Termini sind im Zytosol lokalisiert.

Lediglich in Bezug auf den Aminoterminus könnte diese Analyse zu einem falschen Ergebnis führen, und zwar in dem Fall, wenn es sich bei der ersten Transmembrandomäne um eine später abzuspaltende Signalsequenz handelt. Durch zwei unabhängige Befunde kann dieser Fall jedoch ausgeschlossen werden: Zum einen zeigt die Fusion von Suc2-His4 an die erste Membrandomäne, dass dies ein echtes Membranprotein ergibt, das nur mit einem Detergenz aus der Membran extrahiert werden kann; es erfolgt also keine Spaltung hinter dem Membrananker. Zum anderen wird die zytosolische Lokalisation des Aminoterminus durch die Split-Ubiquitin-Analyse bewiesen: N_{ul} -Der3 interagiert mit Hrd3- C_{ub} -R-Ura3, nicht aber N_{uA} -Der3 und N_{uG} -Der3. Dass die Interaktion von der Eigenschaft des N_{ux} abhängt, setzt dessen Anwesenheit im Zytosol voraus, wo es mit C_{ub} wechselwirken kann.

Die von Bordallo *et al.* gefundenen Ergebnisse beruhten auf Protease-Schutz-Experimenten. Für den falschen Befund kann der Umstand verantwortlich sein, dass sich die Membranen während der Präparation in einer Weise zusammenlagern, dass Der3/Hrd1p verdeckt wird, oder aber eine strukturbedingte Resistenz von Der3/Hrd1p gegen die eingesetzte Protease. In

der Tat zeigen kürzlich durchgeführte Experimente von Gardner *et al.* (2000) eine gewisse Resistenz des carboxyterminalen Bereichs von Der3/Hrd1p gegenüber Trypsin, nicht aber gegenüber Proteinase K.

Nach der Topologie des Moleküls bestimmte ich auch die biologische Funktion von Der3/Hrd1p innerhalb des ER-Degradations-Systems.

Wie ich anhand des Substrats CPY* zeigen konnte, ist Der3/Hrd1p für die Polyubiquitylierung retrotranslozierter Proteine erforderlich. Als wichtiger Beweis für die Eigenschaft von Der3/Hrd1p, als Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Enzym) zu wirken, diente auch seine Fähigkeit zur Autoubiquitylierung *in vitro*. In beiden Fällen der Ubiquitylierung geht die Aktivität des Proteins vollständig verloren, wenn ein Cysteinrest der RING-Domäne durch Serin ersetzt wird, was die zentrale Bedeutung dieses Sequenzmotivs deutlich macht.

Die Identifizierung von Der3/Hrd1p als E3-Enzym bedeutet einen entscheidenden Fortschritt im molekularen Verständnis der zytosolischen Komponente des ER-Qualitätskontrollsystems. Das Modell für die ER-Degradation von CPY*, das sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergibt, ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

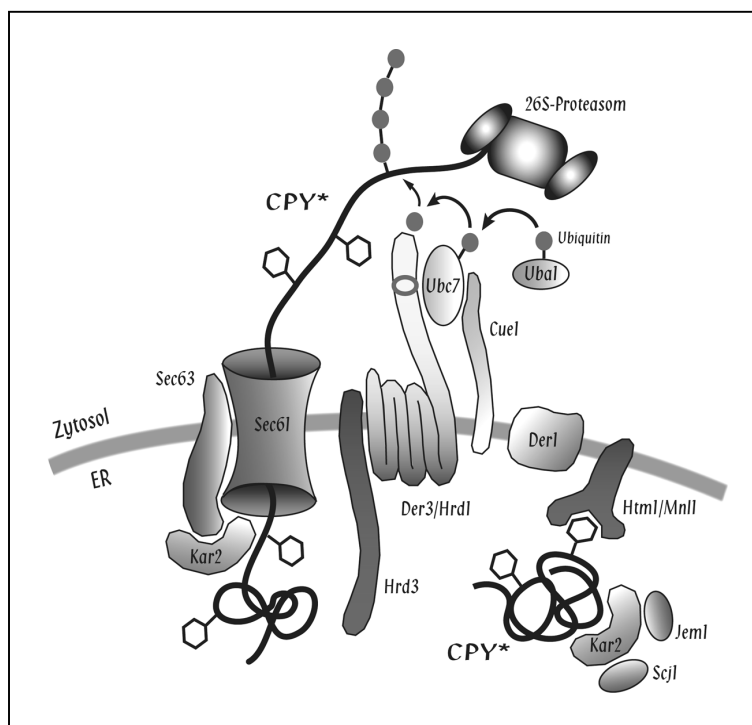


Abb. 4-1: Mechanismus der ER-Degradation von CPY*.

Die an der Ubiquitylierung retrotranslozierter Substrate beteiligten Faktoren sind in erster Linie das Ubiquitin-aktivierende Enzym Uba1p, das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7p und die Ubiquitin-Protein-Ligase Der3/Hrd1p. Die dominierende Rolle von Ubc7p gegenüber den ebenfalls am ERAD-System beteiligten Enzymen Ubc1p und Ubc6p wird durch die hier



gezeigte Interaktion mit Der3/Hrd1p klar bestätigt: Eine GST-Fusion des hydrophilen Bereichs von Der3/Hrd1p vermag *in vitro* Ubc7p zu präzipitieren, nicht aber Ubc1p oder Ubc6p. Hiermit im Einklang steht auch der Befund, dass Der3/Hrd1p im Split-Ubiquitin-Testsystem eine größere Nähe zu Ubc7p als zu Ubc6p zeigt. Allerdings ist die Aussagekraft des letztgenannten Versuchs auf Grund der fehlenden Funktionalität von Der3-C_{ub}-R-Ura3 nur begrenzt. Neuere Untersuchungen zur ER-Degradation von Hmg2p durch *in vivo*-Quervernetzung von Proteinen führten aber zu ähnlichen Resultaten: Der3/Hrd1p weist eine deutlich höhere Affinität gegenüber Ubc7p als gegenüber Ubc1p auf (Gardner *et al.*, 2001; Bays *et al.*, 2001). Ubc6p wurde in diesem Zusammenhang, da es am Abbau von Hmg2p unbeteiligt ist, nicht untersucht.

Die direkte Wechselwirkung zwischen Der3/Hrd1p und Ubc7p ist charakteristisch für E3/E2-Paare und gibt insofern, als die Interaktion von der Funktionalität des RING-Fingers abhängt, Aufschluss über zumindest eine essentielle Funktion dieses Sequenzmotivs. Da das RING-Finger-E3-Enzym selbst keine kovalente Bindung zum Ubiquitin bildet, ist die Rekrutierung des E2-Enzyms in die Nähe des Substrates ein entscheidender Schritt bezüglich der Spezifität der Ubiquitylierungs-Kaskade. Trotz der hohen Affinität zwischen Der3/Hrd1p und Ubc7p ist für die Funktion des Systems *in vivo* der zusätzliche Faktor Cue1p erforderlich. Mögliche Gründe für diese Erfordernis können eine verstärkte Membran-Assoziation von Ubc7p oder auch eine strukturelle Änderung des Proteins durch Assoziation mit Cue1p sein.

Für die Funktion der Proteine Ubc1p und Ubc6p im ERAD-System gibt es verschiedene mögliche Erklärungen: In einem einfachen Modell können sie Ubc7p zwar funktionell ersetzen, spielen aber auf Grund der weit schwächeren Affinität gegenüber Der3/Hrd1p nur eine untergeordnete Rolle. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass Ubc1p und/oder Ubc6p mit einem anderen E3-Enzym als Der3/Hrd1p zusammenspielen und es somit mehrere Ubiquitylierungs-Systeme für ERAD-Substrate gibt. Tatsächlich existieren weitere ER-Membranproteine mit einer RING-Finger-Domäne, u.a. Asi1p, Asi3p und Doa10/Ssm4p. Für Letzteres ist kürzlich eine Funktion als E3-Enzym sowie eine funktionelle Interaktion mit Ubc6p und Ubc7p nachgewiesen worden. Doa10/Ssm4p ist am Abbau des MAT α 2-Transkriptionsfaktors sowie am Abbau von Ubc6p beteiligt. Doppelmutanten von *DER3/HRD1* und *DOA10/SSM4* zeigen eine verstärkte „unfolded protein response“, was auf eine gewisse funktionelle Überlappung der beiden Proteine hindeutet (Swanson *et al.*, 2001). Caldwell *et al.* (2001) postulieren einen alternativen ER-Abbauweg, der von Der3/Hrd1p und auch Hrd3p unabhängig ist und einen Hin- und Rücktransport der Substrate in Richtung Golgi involviert. Verschiedene Mutanten mit blockiertem ER-Golgi-Transport zeigen in der Tat

einen verzögerten Abbau von CPY*. Als Ursache hierfür ist allerdings auch ein indirekter Effekt in Form einer veränderten ER-Morphologie nicht unwahrscheinlich (*C. Taxis*, persönliche Mitteilung).

Neben der Rekrutierung des E2-Enzyms muss die Ubiquitin-Protein-Ligase auch die potentiellen Substrate erkennen und binden. Da die primäre Identifikation der ERAD-Substrate im Lumen des ER erfolgen muss, ist ein Transmembran-Signalweg, der Der3/Hrd1p in den Prozess der Retrotranslokation einbindet, sehr wahrscheinlich. Hrd3p ist dabei ein Kandidat für die lumenale Komponente des Systems, zumal das Vorhandensein dieses Proteins für die Stabilität von Der3/Hrd1p erforderlich ist.

Die Hypothese, dass Der3/Hrd1p, Hrd3p und Sec61p unter Ausbildung eines Retrotranslokons eng miteinander interagieren, versuchte ich durch Split-Ubiquitin-Analysen zu untermauern. Die Versuche lieferten allerdings keine eindeutigen Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen den einzelnen Komponenten, was mit großer Wahrscheinlichkeit durch die fehlende Aktivität des verwendeten Konstrukts Hrd3-C_{ub}-R-Ura3 bedingt ist. Kürzlich präsentierten Gardner *et al.* (2000) Quervernetzungs-Experimente, die stark auf eine Interaktion zwischen Der3/Hrd1p und Hrd3p hindeuten. Die genaue Funktion von Hrd3p im ERAD-System muss aber noch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Betrachtet man die Split-Ubiquitin-Analysen von Der3/Hrd1p und Hrd3p mit Komponenten des Translokons, so fällt lediglich auf, dass Hrd3p mit Sec61p einen stärkeren Effekt zeigt als mit dem Homolog Ssh1p. Allerdings ist der Effekt mit Sec62p noch stärker. Neben der bereits erwähnten fehlenden Funktionalität des Hrd3p-Konstrukts muss dabei auch berücksichtigt werden, dass transiente Interaktionen von ER-Proteinen mit Translokon-Komponenten während der Translokation naturgemäß auftreten müssen (Dünnwald *et al.*, 1999). Insgesamt hat sich das Split-Ubiquitin-System zur Untersuchung des ER-Degradationssystems leider als nicht geeignet erwiesen.

Die ERAD-Substrate verlassen das Translokon ungefaltet und müssten daher vermutlich mit Chaperonen oder ähnlichen Proteinen des Zytosols in Wechselwirkung treten, um im entfalteten Zustand zu bleiben. Die Hsp70-Chaperone Ssa1p bis Ssa4p sind am ER-Abbau von CPY* jedoch nicht beteiligt. Dies ergibt sich eindeutig aus der Tatsache, dass die Abbaurate von CPY* unter Bedingungen, bei denen alle vier Proteine inaktiv sind, unverändert ist. Auch die Inaktivierung des für die Hsp70-Funktion erforderlichen Co-Faktors Ydj1p hat keinerlei Effekt auf den Abbau von CPY*.

Weitere Proteine, die in diesem Zusammenhang zu untersuchen wären, sind die Hsp90-Chaperone Hsp90p und Hsc90p sowie deren Co-Chaperone. In Säugerzellen wurde eine Beteiligung von Hsp90 am Abbau des Insulinrezeptors bereits gezeigt.

Es muss jedoch betont werden, dass CPY* lediglich als Modells substrat für *lösliche* Proteine betrachtet werden darf und die Verhältnisse beim Abbau von Transmembranproteinen völlig andere sein können. So ist z.B. der Abbau von Pdr5* im Gegensatz zu CPY* unabhängig von Der1p und vom lumenalen Chaperon Kar2p. Die Erfordernis zytosolischer Chaperone bei der ER-Degradation von Membranproteinen muss daher gesondert betrachtet werden und Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ein weiteres Protein, das auf Grund neuerer Ergebnisse mit Chaperon-ähnlichen Funktionen in Verbindung gebracht wird, ist die zytosolische ATPase Cdc48p, die einen dodekameren Ring bildet. Ein Komplex aus Cdc48p, Ufd1p und dem peripheren Membranprotein Npl4p ist an der Entfaltung proteasomaler Substrate beteiligt (*P. Silver*, persönliche Mitteilung). Npl4p, das auch als Hrd4p gefunden wurde, ist für den Abbau von Hmg2p erforderlich (*N. Bays*, persönliche Mitteilung). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass der Cdc48-Komplex auch bei der Degradation von CPY* eine Rolle spielen könnte. In der Tat konnte im hiesigen Labor gezeigt werden, dass Ufd1p und Cdc48p für den Abbau von CPY* essentiell sind (*C. Taxis* und *T. Sommer*, persönliche Mitteilung).

Ich konnte zeigen, dass auch die Proteine Rpn10p, Rad23p und Dsk2p, die eine UbA-Domäne als gemeinsames Merkmal haben, für die ER-Degradation von CPY* nicht essentiell sind, zumindest keines der Proteine einzeln. Auf Grund der vermutlich hohen Redundanz von Rad23p und Dsk2p könnten sich diese Proteine bei einer eventuellen Beteiligung am ERAD-System gegenseitig ersetzen; zudem ist die Existenz weiterer UbA-Proteine nicht auszuschließen, die einen Transport ubiquitylierter Substrate zum Proteasom vermitteln. Die genaue Rolle dieser Proteine ist allerdings bei weitem noch nicht abschließend geklärt, ebenso wenig wie ihr Zusammenspiel oder ihre funktionelle Überlappung mit Rpn10p. Das Fehlen dieser Untereinheit beeinflusst die wesentlichen Funktionen des 26S-Proteasoms ganz offensichtlich nicht, und auch im ER-Abbau übernimmt sie, wie ich zeigen konnte, keine spezifische Funktion.

Neuere Untersuchungen bringen Rad23p mit der Frage nach der Deglykosylierung proteasomaler Substrate, die sich auch für CPY* stellt, in Verbindung: Das Protein interagiert direkt mit der N-Glykanase Png1p (*Suzuki et al.*, 2001). Falls diese Interaktion für eine Deglykosylierung von CPY* erforderlich ist, müssen weitere Proteine hier die Rolle von Rad23p übernehmen können, da sein Fehlen auf die Abbaurate praktisch keinen Einfluss hat.



In der vorliegenden Arbeit konnte ich das Protein Der3/Hrd1p als E3-Enzym und somit als eine Schlüsselkomponente im ER-assoziierten Degradationssystem identifizieren. Bei der Behandlung von Krankheiten, die ihre Ursache in einer Über- oder Fehlfunktion des ERAD-Systems haben, kann dieses Wissen in Bezug auf pharmazeutische Ansätze in der Zukunft von Bedeutung sein. Die im Modellorganismus Hefe gewonnenen Erkenntnisse können bei der Untersuchung der entsprechenden Mechanismen in Säugerzellen als Grundlage dienen. Ein Schritt in diese Richtung ist beispielsweise die Identifikation des humanen Proteins GP78 als Homolog von Der3/Hrd1p (A. Weissman, persönliche Mitteilung).

Literaturverzeichnis

- Andersson, H., Nilsson, I. und von Heijne, G. (1996) Calnexin can interact with N-linked glycans located close to the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett.* **397** (2-3) 321-324.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. und Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92** (3) 367-380.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A. und Hampton, R.Y. (2001) Hrd1/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell Biol.* **3** (1) 24-29.
- Bebök, Z., Mazzochi, C., King, S.A., Hong, J.S. und Sorscher, E.J. (1998) The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* **273** (45) 29873-29878.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W. und Craig, E.A. (1996) Functional interaction of cytosolic Hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol. Cell Biol.* **16** (8) 4378-4386.
- Biederer, T., Volkwein, C. und 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** (9) 2069-2076.
- Biederer, T., Volkwein, C. und Sommer, T. (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278** (5344) 1806-1809.
- Biggins, S., Ivanovska, I. und Rose, M.D. (1996) Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. *J. Cell Biol.* **133** (6) 1331-1346.
- Bissinger, P.H. und Kuchler, K. (1994) Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J. Biol. Chem.* **269** (6) 4180-4186.
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A. und Wolf, D.H. (1998) Der3/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol. Biol. Cell* **9** (1) 209-222.
- Bordallo, J. und Wolf, D.H. (1999) A RING-H2-finger motif is essential for the function of Der3/Hrd1p in endoplasmic reticulum associated protein degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **448** (2-3) 244-248.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. und Ciechanover, A. (1998) A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* **17** (20) 5964-5973.
- Brodsky, J.L. und McCracken, A.A. (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10** (5) 507-513.
- Caldwell, S.R., Hill, K.J. und Cooper, A.A. (2001) Degradation of ER quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J. Biol. Chem.* **276** (26) 23296-23303.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M. und Douglas, M.G. (1992a) Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71** (7) 1143-1155.

- Caplan, A.J., Tsai, J., Casey, P.J. und Douglas, M.G. (1992b) Farnesylation of Ydj1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267** (26) 18890-18895.
- Chang, X.B., Cui, L., Hou, Y.X., Jensen, T.J., Aleksandrov, A.A., Mengos, A. und Riordan, J.R. (1999) Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol. Cell* **4** (1) 137-142.
- Chiang, H.L. und Schekman, R. (1991) Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature* **350** (6316) 313-318.
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* **17** (24) 7151-7160.
- Collins, F.S. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256** (5058) 774-779.
- Corsi, A.K. und Schekman, R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **271** (48) 30299-30302.
- Corsi, A.K. und Schekman, R. (1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **137** (7) 1483-1493.
- Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65** 801-847.
- Craig, E.A., Gambill, B.D. und Nelson, R.J. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57** (2) 402-414.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. und Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10** (6) 673-676.
- DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C. und Slaughter, C.A. (1994) PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J. Biol. Chem.* **269** (33) 20878-20884.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/RING-H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15** 435-467.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. und Johnsson, N. (1999) Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **10** (2) 329-344.
- Ellgaard, L., Molinari, M. und Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286** (5446) 1882-1888.
- Enenkel, C., Lehmann, A. und Kloetzel, P.M. (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* **17** (21) 6144-6154.
- Falnes, P.O. und Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12** (4) 407-413.
- Finger, A., Knop, M. und 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** (2) 565-574.

- Franzusoff, A., Rothblatt, J. und Schekman, R. (1991) Analysis of polypeptide transit through yeast secretory pathway. *Methods Enzymol.* **194** 662-674.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. und Tuite, M.F. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* **19** (8) 331-336.
- Freemont, P.S. (1993) The RING-finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **684** 174-192.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C. und Sommer, T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2** (7) 379-384.
- Furukawa, M., Zhang, Y., McCarville, J., Ohta, T. und Xiong, Y. (2000) The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1. *Mol. Cell Biol.* **20** (21) 8185-8197.
- Gardner, R.G. und Hampton, R.Y. (1999) A 'distributed degron' allows regulated entry into the ER degradation pathway. *EMBO J.* **18** (21) 5994-6004.
- Gardner, R.G., Shearer, A.G. und Hampton, R.Y. (2001) In vivo action of the hrd ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic reticulum quality control and sterol regulation. *Mol. Cell Biol.* **21** (13) 4276-4291.
- Gardner, R.G., Swarbrick, G.M., Bays, N.W., Cronin, S.R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C. und Hampton, R.Y. (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J. Cell Biol.* **151** (1) 69-82.
- Gerards, W.L., de Jong, W.W., Boelens, W. und Bloemendal, H. (1998) Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell Mol. Life Sci.* **54** (3) 253-262.
- Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de La Cruz, F.J. und Romisch, K. (1999) Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell Biol.* **147** (7) 1443-1456.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A. und Finley, D. (1998) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell Biol.* **18** (6) 3149-3162.
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. und Peters, J.M. (2000) The RING-H2-finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (16) 8973-8978.
- Goffeau, A. *et al.* (1997) The yeast genome directory. *Nature* **387** (6632 Suppl) 5.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. und Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386** (6624) 463-471.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H. und Huber, R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (20) 10976-10983.
- Guthrie, C. und Fink, G.R., Eds. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology.* San Diego, Academic Press.
- Hampton, R.Y. (2000) ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr. Biol.* **10** (14) R518-521.
- Hampton, R.Y. und Bhakta, H. (1997) Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (24) 12944-12948.

- Hampton, R.Y., Gardner, R.G. und Rine, J. (1996) Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol. Biol. Cell* **7** (12) 2029-2044.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166** (4) 557-580.
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. und Lingappa, V.R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279** (5352) 827-834.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. und Wolf, D.H. (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* **272** (40) 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Simeon, A., Hirsch, H.H., Schiffer, H.H., Teichert, U. und Wolf, D.H. (1991) Lysosomal and non-lysosomal proteolysis in the eukaryotic cell: studies on yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **19** (3) 724-725.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291** (5512) 2364-2369.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67** 425-479.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. und Tzagoloff, A. (1986) Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2** (3) 163-167.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. und Wolf, D.H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **273** (5282) 1725-1728.
- Hilt, W. und Wolf, D.H. (1995) Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol. Biol. Rep.* **21** (1) 3-10.
- Hilt, W. und Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21** (3) 96-102.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30** 405-439.
- Hochstrasser, M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat. Cell Biol.* **2** (8) E153-157.
- Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chau, V. und Varshavsky, A. (1991) The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (11) 4606-4610.
- Hoffman, L. und Rechsteiner, M. (1994) Activation of the multicatalytic protease. The 11 S regulator and 20 S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *J. Biol. Chem.* **269** (24) 16890-16895.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. und Takahashi, R. (2001) An Unfolded Putative Transmembrane Polypeptide, which Can Lead to Endoplasmic Reticulum Stress, Is a Substrate of Parkin. *Cell* **105** (7) 891-902.
- Imamura, T. *et al.* (1998) Involvement of heat shock protein 90 in the degradation of mutant insulin receptors by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **273** (18) 11183-11188.

- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. und Reimann, J.D. (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10** (10) 429-439.
- Jakob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. und Aebi, M. (2001) Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* **2** (5) 423-430.
- Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J. und Aebi, M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J. Cell Biol.* **142** (5) 1223-1233.
- Jentsch, S. und Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* **10** (8) 335-342.
- Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T. und Reins, H.A. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **15** (5) 195-198.
- Joazeiro, C.A. und Hunter, T. (2000) Ubiquitination--more than two to tango. *Science* **289** (5487) 2061-2062.
- Joazeiro, C.A. und Weissman, A.M. (2000) RING-finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102** (5) 549-552.
- Johnson, A.E. und Haigh, N.G. (2000) The ER translocon and retrotranslocation: is the shift into reverse manual or automatic? *Cell* **102** (6) 709-712.
- Johnson, A.E. und van Waes, M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15** 799-842.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (22) 10340-10344.
- Katzmann, D.J., Epping, E.A. und Moyer-Rowley, W.S. (1999) Mutational disruption of plasma membrane trafficking of *Saccharomyces cerevisiae* Yor1p, a homologue of mammalian multidrug resistance protein. *Mol. Cell Biol.* **19** (4) 2998-3009.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. und Shimizu, N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392** (6676) 605-608.
- Klappa, P., Freedman, R.B. und Zimmermann, R. (1995) Protein disulphide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *Eur. J. Biochem.* **232** (3) 755-764.
- Klionsky, D.J. und Emr, S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290** (5497) 1717-1721.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K. und Wolf, D.H. (1996a) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J.* **15** (4) 753-763.
- Knop, M., Hauser, N. und Wolf, D.H. (1996b) N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast. *Yeast* **12** (12) 1229-1238.
- Knop, M., Schiffer, H.H., Rupp, S. und Wolf, D.H. (1993) Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5** (6) 990-996.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** (1) 105-132.

- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M. und Estelle, M. (1998) Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev.* **12** (7) 914-926.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S. und Weissman, A.M. (1999) RING-fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (20) 11364-11369.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268** (5210) 533-539.
- Lyman, S.K. und Schekman, R. (1995) Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **131** (5) 1163-1171.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. und Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* **1** (4) 565-574.
- Mayer, T.U., Braun, T. und Jentsch, S. (1998) Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER- transmembrane protein. *EMBO J.* **17** (12) 3251-3257.
- McClellan, A.J. und Brodsky, J.L. (2000) Mutation of the ATP-binding pocket of SSA1 indicates that a functional interaction between Ssa1p and Ydj1p is required for post-translational translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Genetics* **156** (2) 501-512.
- McClellan, A.J. und Frydman, J. (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat. Cell Biol.* **3** (2) E51-53.
- McCracken, A.A. und Brodsky, J.L. (1996) Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell Biol.* **132** (3) 291-298.
- McGrath, J.P., Jentsch, S. und Varshavsky, A. (1991) UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* **10** (1) 227-236.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. und Cyr, D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* **3** (1) 100-105.
- Melchior, F. und Hengst, L. (2000) Mdm2-SUMO1: is bigger better? *Nat. Cell Biol.* **2** (9) E161-E163.
- Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J. und Rapoport, T.A. (1997) Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* **89** (4) 523-533.
- Murakami, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Omura, S. und Hayashi, S. (1996) Proteasome pathway operates for the degradation of ornithine decarboxylase in intact cells. *Biochem. J.* **317** (Pt 1) 77-80.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. und Craig, E.A. (1992) The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* **71** (1) 97-105.
- Nilsson, I.M. und von Heijne, G. (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **268** (8) 5798-5801.

- Pahl, H.L. (1999) Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol. Rev.* **79** (3) 683-701.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci.* **25** (11) 544-548.
- Pilon, M. und Schekman, R. (1999) Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell* **97** (6) 679-682.
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. und Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388** (6645) 891-895.
- Plempner, R.K., Bordallo, J., Deak, P.M., Taxis, C., Hitt, R. und 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** (22) 4123-4134.
- Plempner, R.K., Deak, P.M., Otto, R.T. und Wolf, D.H. (1999b) Re-entering the translocon from the lumenal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated carboxypeptidase yscY species. *FEBS Lett.* **443** (3) 241-245.
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K. und Wolf, D.H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5p proceeds in a concerted action of Sec61p and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **273** (49) 32848-32856.
- Plempner, R.K. und Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24** (7) 266-270.
- Ploegh, H.L. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280** (5361) 248-253.
- Prinz, A., Hartmann, E. und Kalies, K.U. (2000) Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.* **381** (9-10) 1025-1029.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B. und Kutay, U. (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65** 271-303.
- Rassow, J., von Ahsen, O., Bömer, U. und Pfanner, N. (1997) Molecular chaperons: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends Cell Biol.* **7** (3) 129-133.
- Rose, A.H. und Harrison, J.S., Eds. (1987). *Biology of Yeasts*. The Yeasts. London, Academic Press.
- Russell, S.J., Reed, S.H., Huang, W., Friedberg, E.C. und Johnston, S.A. (1999) The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **3** (6) 687-695.
- Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W. und Madura, K. (1998) Rad23p links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* **391** (6668) 715-718.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. und Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63** (6) 1129-1136.
- Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. und Silver, P.A. (1995) A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J. Cell Biol.* **129** (4) 979-988.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. und Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell Biol.* **148** (6) 1203-1212.

- Seeger, M., Ferrell, K. und Dubiel, W. (1997) The 26S proteasome: a dynamic structure. *Mol. Biol. Rep.* **24** (1-2) 83-88.
- Shamu, C.E., Story, C.M., Rapoport, T.A. und Ploegh, H.L. (1999) The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate. *J. Cell Biol.* **147** (1) 45-58.
- Sidrauski, C. und Walter, P. (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90** (6) 1031-1039.
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122** (1) 19-27.
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. und Lord, J.M. (1999) Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett.* **459** (1) 80-84.
- Smith, S.E., Koegl, M. und Jentsch, S. (1996) Role of the ubiquitin/proteasome system in regulated protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.* **377** (7-8) 437-446.
- Sommer, T. und Jentsch, S. (1993) A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* **365** (6442) 176-179.
- Sommer, T. und Wolf, D.H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *Faseb J.* **11** (14) 1227-1233.
- Spang, A. und Schekman, R. (1998) Reconstitution of retrograde transport from the Golgi to the ER in vitro. *J. Cell Biol.* **143** (3) 589-599.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (9) 5187-5192.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. und Schekman, R. (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **3** (2) 129-142.
- Strahl-Bolsinger, S. und Scheinost, A. (1999) Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **274** (13) 9068-9075.
- Suzuki, T., Park, H., Kwofie, M.A. und Lennarz, W.J. (2001) Rad23 Provides a Link between the Png1 Deglycosylating Enzyme and the 26S Proteasome in Yeast. *J. Biol. Chem.* **276** (24) 21601-21607.
- Swanson, R., Locher, M. und 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** (20) 2660-2674.
- Tachibana, C. und Stevens, T.H. (1992) The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase. *Mol. Cell Biol.* **12** (10) 4601-4611.
- Thumm, M. (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc. Res. Tech.* **51** (6) 563-572.

- Tongaonkar, P., Chen, L., Lambertson, D., Ko, B. und Madura, K. (2000) Evidence for an interaction between ubiquitin-conjugating enzymes and the 26S proteasome. *Mol. Cell Biol.* **20** (13) 4691-4698.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S. und Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101** (3) 249-258.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W.I. und Rapoport, T.A. (2001) Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* **104** (6) 937-948.
- Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J. und Weissman, J.S. (2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* **290** (5496) 1571-1574.
- Tyers, M. und Willems, A.R. (1999) One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* **284** (5414) 601, 603-604.
- Tyson, J.R. und Stirling, C.J. (2000) LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **19** (23) 6440-6452.
- Van Den Hazel, H.B., Kielland-Brandt, M.C. und Winther, J.R. (1996) Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* **12** (1) 1-16.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. und Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1p is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell Biol.* **16** (11) 6020-6028.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (22) 12142-12149.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J. und Deshaies, R.J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol. Biol. Cell* **11** (10) 3425-3439.
- von Heijne, G. (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature* **396** (6707) 111, 113.
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. und McCracken, A.A. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (24) 13797-13801.
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J. und Ploegh, H.L. (1996a) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84** (5) 769-779.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. und Ploegh, H.L. (1996b) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384** (6608) 432-438.
- Wilhovsky, S., Gardner, R. und Hampton, R. (2000) HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* **11** (5) 1697-1708.
- Winzeler, E.A. *et al.* (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285** (5429) 901-906.
- Wittke, S., Lewke, N., Muller, S. und Johnsson, N. (1999) Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol. Biol. Cell* **10** (8) 2519-2530.

-
- Xie, Y. und Varshavsky, A. (1999) The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2-finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *EMBO J.* **18** (23) 6832-6844.
- Xie, Y. und Varshavsky, A. (2000) Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (6) 2497-2502.
- Zachariae, W. und Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **13** (16) 2039-2058.
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D. und Pavletich, N.P. (2000) Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102** (4) 533-539.



Danksagung

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

Ich danke ganz herzlich meiner Frau Andrea sowie meinen Eltern für ihre mentale und finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Meinen Kollegen im Arbeitskreis ER-Degradation und am gesamten Institut für Biochemie der Universität Stuttgart möchte ich danken für jede Form der Unterstützung und Hilfe bei wissenschaftlichen und anderen Fragen und für die gute Zusammenarbeit – im Labor und am Kicker!

Herrn Dr. Nils Johnsson, Köln, danke ich ganz besonders für seine Unterstützung und seinen Rat im Zusammenhang mit dem Split-Ubiquitin-System und die Bereitstellung zahlreicher Stämme und Plasmide.

Für weitere Stämme, Plasmide und Antikörper danke ich Herrn Dr. T. Sommer, Berlin, Herrn PD Dr. R. Kölling, Düsseldorf, und Frau Dr. S. Strahl-Bolsinger, Regensburg.



Veröffentlichungshinweis

Ein Großteil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde in folgendem Artikel publiziert und bei einer Tagung in Form eines Posters vorgestellt:

Deak, P.M. und Wolf, D.H. (2001) Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J. Biol. Chem.* **276** (14) 10663-10669.

International Meeting on Yeast Cell Biology, Cold Spring Harbor, 14.-19.8.2001:

Deak, P.M., Taxis, C. und Wolf, D.H. The ubiquitin-proteasome system: its function in protein quality control of the endoplasmic reticulum.

Weitere Veröffentlichungen:

Plempner, R.K., Bordallo, J., **Deak, P.M.**, Taxis, C., Hitt, R. und Wolf, D.H. (1999) Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J. Cell Sci.* **112** (22) 4123-4134.

Plempner, R.K., **Deak, P.M.**, Otto, R.T. und Wolf, D.H. (1999) Re-entering the translocon from the luminal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated carboxypeptidase yscY species. *FEBS Lett.* **443** (3) 241-245.