Proteinqualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum: Variationen im Abbaumechanismus von löslicher und membrangebundener missgefalteter CarboxypeptidaseY (CPY*)

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

vorgelegt von
Christof Taxis
aus Schorndorf

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Mitberichter: PD Dr. Hans Rudolph
Tag der mündlichen Prüfung: 19.9.2002

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart
2002

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen 5
Zusammenfassung 6
Abstract 8
Introduction 8
New ERAD degradation substrates 9
Involvement of the Cdc48-complex in ERAD 11
ER quality control depends on a functionally early secretory pathway 11
Einleitung 15
Das sekretorische System 15
Organellen des sekretorischen Systems in Hefe 15
Der Transport durch das sekretorische System 16
ATPasen der AAA-Familie 17
Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum 18
Erkennung missgefalteter Proteine 18
Zurückhaltung 20
Rücktransport ins Zytosol 21
Abbau 22
Die „Unfolded Protein Response“ (UPR) 23
Aufgabenstellung 24
Material und Methoden 25
Bezugsquellen von Chemikalien und Geräten 25
Saccharomyces cerevisiae-Stämme 26
Escherichia coli-Stämme 28
Vektoren 28
Synthetische Oligonukleotide 29
Molekularbiologische Methoden und Plasmidkonstruktionen 30
Wachstum und Konstruktion von Hefestämmen 31
Biochemische Methoden 32

Ergebnisse 37
Charakterisierung der neuen ERAD Substrate CT* und CTG* im Vergleich mit CPY* 37
Die neuen Abbausubstrate CT* und CTG* 37
Lokalisierung von CT* und CTG* 38
Reifung und Aktivität von CT und CTG 39
Abbau von CT* und CTG* 40
Einfluss von Chaperonen der Hsp70 Familie und assoziierter Proteine auf den Abbau von CT* und CTG* 42
Beteiligung des Cdc48p-Npl4p-Ufd1p Komplexes am Abbau von ungefalteten Proteinen aus dem ER 46
Vergleich der Substrate CPY*, CT* und CTG* in Bezug auf Komponenten der ERAD-Abbaumaschinerie 50
ERAD und sekretorischer Weg 51
Proteintransport zwischen dem ER und Golgi Apparat ist zum Abbau von CPY* notwendig 51
CPY* entkommt bei defekter Abbaumaschinerie der ER Qualitätskontrolle 56
Morphologie des sekretorischen Weges in ERAD blockierten Mutantenstämmen 59
Einfluss von ERAD auf den Transport durch das sekretorische System 62
Diskussion 64
Unterschiede im Abbau von CPY*, CT* und CTG* 64
Einfluss des sekretorischen Transports auf ERAD 68
Einfluss von ERAD auf das sekretorische System 70
Ausblick 71
Literaturverzeichnis 73
Anhang 85
Klonierungsstrategie zum Erhalt des CTG* kodierenden Vektors pMA1 85
Veröffentlichungshinweise 86

Abkürzungen

AAA	„ATPase associated with a variety of cellular activities”
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BTPNA	N-Benzoyl-L-Tyrosin-p-Nitroanilid
CM	synthetisches Vollmedium
COPI	„coat protein complex I“
COPII	„coat protein complex II“
CPY	Carboxypeptidase yscY
CPY*	CPY^{G255R}
CT*	CPY*-Transmembrandomäne
CTG*	CPY*-Transmembrandomäne-grün-fluoreszierendes-Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	„endoplasmic reticulum associated protein degradation“
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure])
HRPO	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin Klasse G
kDa	Kilodalton
min	Minuten
MV	Mineralmedium
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PrA	Proteinase yscA, Pep4p
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNARE	„soluble N-ethylmaleimide sensitive factor associated protein receptor“
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	„unfolded protein response“
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
YPD	Glucose Vollmedium

Zusammenfassung

Geregelter Proteinabbau ist eine Möglichkeit für eukaryontische Zellen Stoffwechselwege und Enzymaktivität zu regulieren. Dies ermöglicht ihnen Wachstum, Differenzierung und metabolische Adaption. Der Abbau nicht funktioneller oder falsch gefalteter Proteine schützt die Zelle vor Proteinablagerungen, die Zellfunktionen entscheidend stören und zur Entwicklung von Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson, führen können. Eine wichtige Aufgabe ist hierbei die Kontrolle der Proteine, in Bezug auf ihre intakte Struktur, die für das sekretorische System bestimmt sind und ihren Wirkungsort im endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi Apparat, der Vakuole oder an der Plasmamembran haben. Alle diese Proteine unterzieht die Zelle nach dem Transport ins ER einer Qualitätskontrolle; falsch gefaltete Proteine werden zurückgehalten und dem Abbau über das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von drei unterschiedlichen Substraten verglichen, die von der Qualitätskontrolle im ER erkannt und dem Abbau zugeführt werden. Alle drei Substrate besitzen den gleichen, falsch gefalteten Proteinteil im Lumen des ER, die punktmutierte Carboxypeptidase yscY (CPY*). Es wurde untersucht, ob Komponenten der Abbaumaschinerie variieren, wenn an CPY* eine Transmembrandomäne (CPY*-Transmembrandomäne, Abk.: CT*) oder noch zusätzlich zur Transmembrandomäne das grün fluoreszierende Protein (GFP) als zytosolische Domäne angefügt wird (CPY*-Transmembrandomäne-GFP, Abk.: CTG*). Es konnte gezeigt werden, dass CT* und CTG* Typ I Membranproteine sind, deren N-terminale, CPY* enthaltende Teile glykosyliert werden und sich im ER-Lumen befinden, wohingegen deren C-terminale Teile im Zytosol lokalisiert sind.

Aus früheren Arbeiten waren einige der zum Abbau von CPY* notwendigen Proteine bekannt. Es wurde deshalb untersucht, ob sie auch bei der Degradation von CT* und CTG* eine Rolle spielen. Es wurde festgestellt, dass CT* und CTG*, wie CPY*, über das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Die Degradation beider Substrate ist in proteasomalen Mutanten verlangsamt. Ebenso sind zum Abbau die Ubiquitin übertragenden Proteine Ubc1p und Ubc7p zusammen mit der Ubiquitin-Ligase Der3/Hrd1p notwendig. Des Weiteren wurde gefunden, dass die AAA-ATPase Cdc48p benötigt wird. Dagegen wird Kar2p, ein Chaperon aus dem ER Lumen, nur für den Abbau von CPY* gebraucht, nicht jedoch für CT* und CTG*.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Ssa-Familie der zytosolischen Hsp70 Chaperone Einfluss auf den Abbau von CT* und CTG* ausübt. Es war bekannt, dass diese Chaperone nicht für den Abbau von löslichen Substraten benötigt werden. Es wurde gefunden, dass sie für die Degradation von CTG* essenziell sind, nicht jedoch für CT*. Die Chaperone sind vermutlich nötig, um die zytosolische GFP-Domäne in CTG* zu entfalten.

Im Rahmen der Arbeiten zum Einfluss der AAA-ATPase Cdc48p auf den CPY* Abbau wurde festgestellt, dass eine Blockierung des Transportes vom ER zum Golgi einen Defekt im Abbau von CPY* zur Folge hat. Dies ist wahrscheinlich auf eine Reduzierung des ER oder die Misslokalisierung von Kar2p in diesen Transportmutanten zurückzuführen. Doppelmutanten, die Transportdefekte zwischen ER und Golgi aufweisen und gleichzeitig die Fähigkeit verloren haben, auf ungefaltete Proteine im ER zu reagieren, können CPY* praktisch überhaupt nicht mehr abbauen.

Eine Haemagglutinin-Tag (HA) Version von CPY* wurde mit Hilfe von elektronenoptischen Aufnahmen in der Hefezelle lokalisiert. CPY* kann bei Blockade des Abbaus aus dem ER entkommen und findet sich dann im Golgi, der Vakuole und sezerniert im Medium. Diese Sekretion von CPY* konnte unabhängig hiervon auch biochemisch mit Hilfe von Immunodetektion bestätigt werden. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass die Vakuole zum Abbau von CPY* in *Δder1* Zellen beiträgt.

In Mutanten, die Defekte im Abbau von missgefalteten Proteinen aus dem ER aufweisen, wird die Morphologie des ER und Golgi verändert und der Transport von Wildtyp CPY durch das sekretorische System verlangsamt.

Abstract

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the folding compartment for proteins destined to operate in the secretory system. To ensure correct functioning of the secretory system, the folding process of newly synthesized proteins has to be monitored. Proteins, which do not reach their native conformation, have to be removed from the ER. This degradation process was named ER associated protein degradation (ERAD). However, not only misfolded proteins are degraded via ERAD. In addition, the enzymatic activities of several proteins, like HmgCoA-reductase, oleic acid synthase or the ubiquitin-conjugating-enzyme Ubc6p, are regulated through degradation via ERAD. The different requirements of the many substrates are met by modulation of the machinery, which performs ERAD. ERAD can be divided into four steps: 1) recognition, 2) retention, 3) dislocation to the cytosol and 4) degradation through the ubiquitin-proteasome-system.

The recognition is mediated through a not yet identified system in the ER. It is believed that the prolonged exposure of hydrophobic patches, which are recognized by chaperones, lead to degradation of a protein. Most likely, the time-period available to fold a glycoprotein is determined by the processing of the inner mannose residue. Proteins, which are not correctly folded after this sugar is cleaved off by mannosidase I, are targeted for degradation. In yeast, this targeting step involves probably the lectin Htm1p.

Misfolded proteins are retained through the binding of chaperones, like Kar2p, protein-disulfide-isomerase (PDI) or calnexin, all of which bear retention signals for ER localization. This mechanism prevents partly folded proteins from being transported out of the ER. Another retention system is used to ensure complex assembly in the ER. Complexes, which are incompletely assembled, expose retention motifs, like the dilysine motif. Therefore, they remain in the ER. After assembly of the complex, these retention motifs are buried inside the complex. Then, they can be transported out of the ER.

Unfolded proteins targeted for degradation, are brought back to the translocon and transported out of the ER. They leave the ER through the same pore, through which they entered the ER. The driving force for this dislocation step is still unknown. It was speculated that cytosolic chaperones, the ATPases of the proteasome or polyubiquitination could prevent the peptide chain from slipping back into the ER.

The dislocated substrate is destroyed by the ubiquitin-proteasome-system in the cytosol. The ubiquitin-system tags proteins for degradation through the attachment of multi-ubiquitin chains. Subsequently, the ubiquitin-tagged proteins are destroyed in the proteasome. Ubiquitin is a small protein of 76 amino acids, which is highly conserved in all eukaryotes. It is bound via its C-terminus to a lysine residue in the substrate molecule. Sequentially more ubiquitin moieties are

linked to lysine residue 48 of the preceding ubiquitin molecule yielding a polyubiquitin chain. This process involves generation of a thioester-bond between ubiquitin and an activating enzyme (E1) followed by its transfer to an ubiquitin-conjugating-protein (E2). Activated ubiquitin is then linked to the substrate with the help of an ubiquitin-ligase (E3). ERAD in yeast uses several E2 and E3 enzymes depending on the nature of the substrate. The degradation of CPY*, a mutated version of the carboxypeptidase yscY, depends on the action of the E2 enzymes Ubc1p, Ubc6p and Ubc7p and the E3 Der3/Hrd1p. Ubc6p, another ERAD-substrate, needs the E2 Ubc7p and the E3 Ssm4/Doa10p for degradation.

After polyubiquitination took place, the substrates are degraded by the proteasome. The proteasome is a self-compartmentalized multi-subunit protease complex, which is responsible for regulated protein breakdown in the cytosol. Proteasomes consist of a 28-subunit proteolytic core particle, capped at one or both sides by regulatory complexes. The core particle is formed from four seven membered rings. The rings are stacked together in a $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ structure and form a hollow cylinder. The proteolytic sites are formed by the β-type subunits with the active site facing the interior of the cylinder. Only six of the β-type subunits are active in yeast, the others do not exhibit proteolytic activity. The regulatory particle contains six ATPases and several other proteins. Altogether, they are thought to recognize, bind, unfold and deliver the substrate into the central cavity of the core particle for destruction.

The ER quality control machinery is accomplished by another system, the so-called unfolded protein response (UPR). This response is the cellular answer to the accumulation of unfolded proteins in the ER. The expression of more than 300 proteins is up regulated, when yeast cells are treated with reductive agents or chemicals, which interfere with glycosylation. Ire1p, together with Kar2p, monitors the ER for unfolded proteins. When unfolded proteins are present, Ire1p mediates the splicing of *HAC1* mRNA, which results in the production of the transcription factor Hac1p. Ultimately, Hac1p activates the transcription of the proteins necessary to protect the ER from unfolded proteins. Among the targets are chaperons like Kar2p, PDI and cyclophilins, proteins functioning in ERAD, for example Der1p, Der3/Hrd1p and Hrd3p, glycosylation, lipid metabolism and secretion.

The present study investigated cellular components necessary to degrade two new ERAD substrates. These new substrates are membrane bound variants of CPY*. The results were compared with the well-studied ER lumenal substrate CPY*. The involvement of the AAA-family protein Cdc48p and its complex partners in ERAD were also investigated.

Furthermore, the relation between secretion and ERAD was studied. It was tested, whether the early secretory pathway and a working UPR was required for efficient ER degradation. In addition, the influence of defective ERAD on the secretory system was investigated. The morphology and the secretory competence of ERAD deficient cells were studied.

New ERAD degradation substrates

To study the components necessary for degradation of soluble and membrane proteins, a set of misfolded proteins with CPY* as degradation motif was constructed. A transmembrane domain as well as a GFP (green fluorescent protein) tagged transmembrane domain was fused to the C-terminus of CPY* to generate CT* (CPY*-transmembrane domain) and CTG* (CPY*-transmembrane domain-GFP).

The fusion proteins were both found to be embedded in a membrane. Treatment of intact microsomes with detergents solubilized the fusion proteins. Other chemicals, like urea, potassium acetate or high pH, failed to do so. Treatment with Endoglucosidase H decreased the molecular mass of CT* and CTG*, indicating that the N-glycosylation sites in the CPY* part of the fusion protein were recognized inside the ER. Protease protection assays with intact microsomes showed that the CPY* part of the molecules were protected from the protease. In the case of CTG*, the molecular mass decreased after protease treatment and the protein was no longer recognized by an antibody against GFP in western blots. Fluorescence microscopy with living yeast cells revealed the fusion protein being localized in the ER. Altogether, this proofs that CT* and CTG* are membrane proteins with their N-terminal CPY*-part located in the ER lumen and their C-terminus in the cytosol.

The membrane anchor might be a degradation motif itself, which is recognized by the ER quality control, independent of the point mutation in the CPY* part of the molecule. To exclude this possibility, mutant CPY* was exchanged with wild type CPY in the fusion proteins to generate CT (CPY-transmembrane domain) and CTG (CPY-transmembrane domain-GFP). Both molecules did show CPY specific activity towards an artificial substrate, whereas CPY*, CT* and CTG* have no CPY specific activity. Furthermore, Western blotting revealed both, CT and CTG, were processed to molecules with a molecular mass equal to matured CPY, whereas there was no such processing of CPY*, CT* and CTG*. This suggests that CT and CTG reach the vacuole and are processed to mature CPY. Therefore, the transmembrane domain does not interfere with the folding of CPY and is no degradation motif itself. Only the CPY* part of CT* and CTG* renders the molecules unstable.

CT* and CTG* are unstable proteins. CT* has a half-life of 20 min, CTG* of almost 40 min at 30°C. Cycloheximide- and pulse chase experiments showed that CT* and CTG* share the same basic ERAD machinery with CPY*. Degradation is carried out by the proteasome after polyubiquitination by the E2s Ubc1p and Ubc7p together with the E3 Der3/Hrd1p.

Nevertheless, there are differences in the degradation of the three substrates. The degradation of CPY* depends on the ER lumenal chaperone Kar2p, whereas degradation of CT* and CTG* are independent of Kar2p. These experiments indicate that Kar2p is not involved in recognizing the unfolded state of CPY*. The Hsp70 Ssa-chaperone family in the cytosol is involved in the turnover of CTG*, but dispensable for CT* degradation. Most likely, the chaperones are neces-

sary to unfold the GFP-part of the molecule before degradation. When the ER-import sequence of CTG* is exchanged with the import sequence of invertase, which leads to cotranslational import into the ER, the degradation defect in the Ssa1-45p temperature sensitive mutant did not change. This indicates that the degradation defect observed in these cells is not due to import problems of the substrate.

The Hsp40 family of co-chaperones binds with their DnaJ-box to Hsp70 molecules to modulate their substrate specificity. In yeast, there are more than 20 DnaJ-Proteins present. To identify the Hsp40s, which are involved in CTG* degradation, cycloheximide chase experiments were performed with DnaJ-protein knockout mutants. Yeast strains with a decreased turnover of CPY* were further studied in pulse chase analysis. A decreased turnover of CTG* was found in three mutant strains, *Δhlj1*, *Δygl128* and *Δypr061*.

The studies on the CPY* variants CT* and CTG* showed that the ERAD machinery is modulated to meet differences in degradation substrates. There are certain compounds, which are essential for turnover of all three substrates, but additional proteins are recruited if necessary.

Involvement of the Cdc48-complex in ERAD

To confirm previous results of J. Bordallo, pulse chase experiments were performed to assess the stability of CPY* in Cdc48p mutants. This confirmed that Cdc48p is involved in the turnover of CPY*. In addition, overexpression of Cdc48p decreased the degradation of CPY*. Mutations in the complex partners Ufd1p and Npl4p of Cdc48p led to stabilization of CPY*, too. This complex is also involved in the maintenance of the lipid composition. It is part of the machinery that regulates the oleic acid synthase activity. Changes in the lipid composition may interfere with ERAD. However, adding oleic acid to the medium does not change the turnover of CPY* in *ufd1-1* cells. This shows that the complex is directly involved in ERAD and does not act through changes in the lipid composition. Degradation of CT* and CTG* depend also on Cdc48p. This indicates that the whole complex is generally involved in ERAD. Ufd3p, a protein of the so called ubiquitin fusion degradation (ufd) pathway, which is involved in ubiquitin homeostasis, is also necessary for CPY* degradation.

ER quality control depends on a functionally early secretory pathway

The degradation of CPY* was analyzed in mutants defective in anterograde transport between the ER and Golgi. The mutant alleles *sec12-1*, *sec23-1*, *ufe1-1*, *sed5-1* and *sec18-1*, which block vesicular transport at restrictive conditions, were used to measure CPY* turnover. Sec12p, the nucleotide-exchange factor, which recruits Sar1p to the ER membrane, and Sec23p are both necessary for COPII coated vesicle formation. Ufe1p and Sed5p are t-SNAREs of the ER and Golgi, respectively. They are involved in the fusion of vesicles with the target membrane. Sec18p,

the yeast homologue of the mammalian NSF (N-ethylmaleimide-sensitive-factor), is required for vesicular transport in multiple stages of the secretory pathway. A defect in any of these proteins considerably reduces the degradation rate of CPY*. The half-life of CPY* increases about 2 (*sec12-1*, *sec23-1* and *sed5-1*) to 6-7 (*ufe1-1*, *sec18-1*) fold in mutant cells compared to wild type. The block of anterograde transport between ER and Golgi was monitored by maturation of proteinase yscA (PrA) in the mutant strains at restrictive conditions. In case of the *ufe1-1* strain, a tiny fraction of matured PrA was visible after 60 min of chase. In all the other mutants, PrA remained in the pro-form. The degradation of CPY* observed in the *sec12-1* mutant cells might be due to the action of a close homologue, Sed4p, which is also involved in the generation of COPII coated vesicles at the ER membrane. It was tested if a deletion of *SED4* influences the degradation rate of CPY*, either as a single knockout or in conjunction with the *sec12-1* mutation. In both cases, there was no detectable change in half-life of CPY*.

Ufe1p is known to function in two different membrane fusion events: it is involved in the homotypic fusion of ER membranes and in the heterotypic fusion of COPI-coated vesicles with the ER membrane. To distinguish between the two different fusion events the AAA-ATPases Cdc48p and Sec18p were overexpressed in temperature sensitive *ufe1-1* mutant cells. Cdc48p is involved in homotypic membrane fusion whereas Sec18p is the homolog used in heterotypic fusion of COPI vesicles with the ER membrane. Overexpression of Cdc48p rescued the temperature sensitivity of the *ufe1-1* mutant but was unable to enhance the degradation of CPY*. Overexpression of Sec18p, on the other hand, did not rescue the temperature sensitivity of an *ufe1-1* mutant. Interestingly, it was able to partially overcome the *ufe1-1* mediated degradation defect of CPY* in cells under restrictive conditions.

As a control, it was tested if Sec1p, a protein involved in docking of secretory transport vesicles to the plasma membrane, influences ERAD. As expected, a temperature sensitive mutant, *sec1-1*, did not alter the degradation of CPY* under restrictive conditions as compared to wild type. Therefore, defects in secretion have no unspecific influence on ERAD.

Using the DNA microarray technique, Travers and co-workers showed that transcription of many genes involved in ER-Golgi transport is up regulated upon stress in the ER. Transcription of Sec23p is enhanced by induction of the UPR, while transcription of Ufe1p is not. Previous studies did not find an alteration in CPY* degradation in *Δire1* cells under non-stress conditions at 30°C. However, the degradation rate of CPY* is prolonged in *Δire1* cells at 37°C. To examine whether there is a synergistic effect between UPR and ER-Golgi transport, the *Δire1* mutation was combined with mutations in Sec23p and Ufe1p. Double mutants of *Δire1* with either *ufe1-1* or *sec23-1* resulted in nearly complete arrest of CPY* degradation under restrictive conditions.

It was then tested if a block in retrograde transport from the Golgi to the ER would influence the degradation rate of CPY* as much as a block in anterograde transport does. The degradation of CPY* was measured in yeast cells defective in Sec21p or Sec27p, two components of the

COPI complex. Degradation of CPY* is only moderately affected in *sec21-1* or *sec27-1* cells at restrictive conditions. Proteins, which cannot be retrograde transported from the Golgi to the ER, might travel to the vacuole for degradation. Therefore, it was checked if vacuolar degradation contributes to the decay of CPY* in the COPI mutants. A mutation in Sec27p was combined with a deletion of the *PEP4* gene, leading to a proteolysis defective vacuole. However, the degradation of CPY* is not altered in this double mutant. A *pep4* single mutant degrades CPY* like a wild type strain. Anterograde transport is partially affected in *sec21-1* and to a lesser degree in *sec27-1* cells. Measuring the PrA maturation, it was shown that anterograde transport is partially affected in the mutant strains at the conditions used. Retrograde transport is defective in these mutants at 37°C. It is known that Emp47p is degraded in the vacuole, when its recycling via COPI-coated vesicles is inhibited. In the mutants, Emp47p is rapidly degraded under the conditions used for the CPY* degradation experiments. This shows that even though retrograde transport is defective in these cells, CPY* is degraded efficiently.

One of the possible models that would explain these results is the existence of a special ER-derived compartment for degradation, reached by vesicular transport. Such a mechanism was proposed recently for mammalian cells. To test this model, the localization of CPY* was analyzed by electron microscopy and immuno-gold visualization of an HA-tagged version of CPY*. CPY*-HA is degraded in the same way and with similar kinetics as non-tagged CPY*. CPY*-HA is localized to the ER/nuclear envelope and to the peripheral ER, while the later compartments of the secretory pathway are almost free of label in wild type cells. A yeast strain depleted of Der1p, which is defective in degradation of CPY*, was used to analyze whether CPY*-HA is accumulating in a novel compartment. In *Δder1* cells, like in wild type cells, most of the CPY*-HA was found at the ER/nuclear envelope and the peripheral ER. CPY*-HA was also found in the Golgi apparatus and the vacuole. A fraction of CPY*-HA was secreted outside the cell. Control cells, which do not express CPY*-HA, typically show few gold particles inside the nucleus and in the cytosol and none in any membranous structures. A specialized compartment for ERAD was not found, neither in wild type, nor in *Δder1* cells. Both, this data and data from the various transport mutants suggest that secondary effects are the reason for the CPY* degradation defects in these mutants. The degradation of CPY* depends on Kar2p, therefore the mislocalization of Kar2p in the ER to Golgi transport mutants, observed by Nishikawa et al., 1994, might be the cause for the different degradation kinetics of CPY*.

The localization of CPY* was also analyzed by Western blotting. This confirmed the EM data: in wild type cells a minor fraction of CPY* was secreted into the medium, whereas in *Δder1* and *Δder3/hrd1* cells more CPY* appeared in the medium. Moreover, the amount of secreted CPY* was higher than that of Kar2p in these cells. A very faint Kar2p signal was found in the extracellular fraction. It is known that Kar2p is secreted when the HDEL retrieval pathway is saturated. Pulse chase experiments were performed in cells with impaired vacuolar degradation due to deletion of the *PEP4* gene, to analyze the fate of CPY* in the vacuole. The degradation of CPY* was the same in *Δpep4* as in wild type cells. However, the degradation in

Δder1 Δpep4 double mutants was slower than in *Δder1* single mutant cells. These experiments showed that CPY* escaped the retrieval system in the ER, when its degradation was inhibited. Most likely, the unfolded proteins exceed the amount of chaperones present in the ER. Chaperones are necessary to retain unfolded proteins in the ER.

EM-images revealed that morphological changes are visible in ERAD deficient cells. In *Δder1, Δder3/hrd1, Δhrd3* and *der6-1* cells the Golgi apparatus appears as stacked cisternae in many cells compared to a typical wild type cell, which contains disconnected Golgi structures. Stacked Golgi structures were previously observed in yeast mutant cells defective in intra-Golgi transport, such as in *sec7-1* cells at non-permissive conditions, but rarely in wild type cells. Mutants defective in ER degradation *(Δder1, Δder3/hrd1, Δhrd3* and *der6-1*) also exhibit a considerably proliferated ER. These morphological changes are absent in cells, where ER degradation is abolished in conjunction with the unfolded protein response. The ER does not proliferate and the Golgi apparatus has normal appearance in *Δder1 Δire1* cells.

These observations raised the question of whether the morphological changes in the ER and Golgi influence the secretory function of these organelles. To address this question, the maturation kinetics of wild type CPY was measured in wild type and *Δder1* mutant cells. Distinct forms of CPY reflect the transport of this enzyme from the ER via the Golgi to the vacuole. The core glycosylated pro-CPY precursor in the ER has a molecular mass of about 67 kDA (p1CPY). The oligosaccharides of CPY are modified resulting in the p2CPY form of 69 kDa in the Golgi. After transport to the vacuole, CPY is matured (mCPY) to a final form of 61 kDa. The transport of wild type CPY is not delayed to a significant degree in cells lacking Der1p. However, when CPY*-HA is expressed simultaneously with wild type CPY in Der1p deficient cells, the maturation of CPY from the p2CPY Golgi form to the mature vacuolar form is considerably delayed. Surprisingly, the exit of pro-CPY from the ER seems to be undisturbed: there is no difference in the maturation of p1CPY between wild type and *Δder1* cells expressing CPY*-HA. Furthermore, the maturation is also the same as that observed in wild type cells not co-expressing CPY or CPY*-HA. As a control, CPY was expressed exogenously in wild type and *Δder1* cells and the maturation of CPY was measured. Under these conditions, every step of the process was delayed in both strains, starting with a slower exit from the ER. Both, the electron microscopy images and the CPY maturation experiments suggest that escape of unfolded proteins from the ER disturbs the secretory competence of the later stages of the secretory pathway.

In conclusion, it was shown that modifications in an unfolded model substrate lead to modulations in the degradation machinery. Furthermore, the secretory system and ERAD are influencing each other. Disturbance in one part lead to defects in the other.

Einleitung

Das sekretorische System

Organellen des sekretorischen Systems in Hefe

In eukaryontischen Zellen wird das sekretorische System von mehreren membranumschlossenen Organellen gebildet, die durch Kompartimentierung unterschiedliche Stoffwechselvorgänge ermöglichen und untereinander durch vesikuläre Transportvorgänge in Verbindung stehen.

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist der Eintrittsort für Proteine in das sekretorische System. Es besteht in *S. cerevisiae* aus einem dynamischen, tubulären Netzwerk in der Nähe der Plasmamembran und ist mit der Kernmembran verbunden (Prinz et al., 2000). Proteine werden über das ER in das sekretorische System eingeschleust; dabei fällt dem ER die Aufgabe zu, neu synthetisierten Proteinen ihre korrekte Faltung zu ermöglichen. Proteine werden bei der Synthese durch die Membran transportiert und noch während des Transportes durch die Membran mit Zuckerresten modifiziert, wenn spezifische Glykosylierungssequenzen in der Peptidkette vorliegen (Helenius und Aebi, 2001). Wenn das Protein vollständig ins ER transportiert wurde, faltet es sich mit Hilfe von Chaperonen; ferner werden weitere Modifikationen, wie die Bildung von Disulfidbrücken vorgenommen. Das Lumen des ER enthält zur Unterstützung der Faltung eine Vielzahl von Chaperonen, Peptidyl-Prolyl-Isomerasen und Protein-Disulfid-Isomerasen (Zapun et al., 1999).

Das ER hat die wichtige Aufgabe die Proteinqualitätskontrolle für die weiteren Organellen im sekretorischen System zu übernehmen, dies erfolgt vor dem Transport der Proteine aus dem ER (Chevet et al., 2001). Auf dieses Überwachungssystem wird im zweiten Teil dieser Einleitung eingegangen. Weitere Aufgaben des ER sind die Synthesen von Phospholipiden oder Zuckerresten, die sich teilweise an der Außenseite des ER abspielen oder die Bildung eines Membranpotenzials durch Aufrechterhaltung eines Ionengefälles zwischen ER und Zytosol (Helenius und Aebi, 2001; Fewell et al., 2001).

Der Golgi Apparat ist die nächste Station im sekretorischen System. Er besteht aus einer Reihe von abgeflachten Membransäcken (Zisternen), die in höheren Eukaryonten stapelförmig angeordnet sind, in *S. cerevisiae* jedoch im allgemeinen ohne Zusammenhang in der Zelle verteilt sind (Morin-Ganet et al., 2000; Rambourg et al., 1993; Rambourg et al., 1995; Rambourg et al., 2001). Der Transport sekretorischer Proteine durch den Golgi erfolgt entweder durch vesikulären Transport oder durch Reifung der Zisternen. Bei letzterem Modell geht man davon aus, dass die Zisternen von einem Zwischenkompartiment (ERGIC: „ER Golgi intermediate compartment“) über das Cis-, Mittlere- und Trans- Golgi Kompartiment ins Trans-Golgi-Netzwerk verwandelt werden. Golgi residente Proteine werden dabei immer wieder durch vesikulären Transport in ihr ursprüngliches Kompartiment zurück transportiert. Diese Sortierung erfolgt

über bestimmte Aminosäuresequenzen. Durch den Reifungsprozess der Zisternen wird sichergestellt, dass sekretorische Proteine die Modifikationen des jeweiligen Kompartiments erhalten und auch sehr große Proteinaggregate transportiert werden können. Im Trans-Golgi-Netzwerk werden die Proteine entweder zu Endosomen und dann weiter zum Lysosom/Vakuole gebracht oder in sekretorische Vesikel verpackt und zur Plasmamembran transportiert. (Glick, 2000).

Die Vakuole ist das Äquivalent zum Lysosom der höheren Eukaryontenzellen und hat einige spezifische Aufgaben zu erfüllen: die Hydrolyse von Makromolekülen, die Regulation von pH Wert und osmotischem Druck und die Lagerung von Phosphaten, Aminosäuren und Ionen. Unter Hungerbedingungen wird durch Autophagozytose unspezifisch zelluläres Material in die Vakuole transportiert und dort abgebaut um der Zelle die zum Überleben notwendigen Grundbausteine zur Verfügung zu stellen (Klionsky und Ohsumi, 1999; Thumm, 2000).

Der Transport durch das sekretorische System

Der Transport zwischen den Organellen geschieht durch membranumschlossene Vesikel, deren Transport sehr genau geregelt ist, damit die Vesikel spezifisch mit der Zielmembran verschmelzen. Die einzelnen Transportvorgänge können spezifisch unterbrochen werden, indem man einzelne Proteine der Transportmaschinerie in ihrer Funktion inhibiert. Dadurch lassen sich die Auswirkungen der Blockade eines Transportschrittes auf andere zelluläre Vorgänge studieren. So kann man den Transport zwischen dem ER und Golgi Apparat an verschiedenen Stellen unterbrechen, z. B. bei der Bildung von COPII Vesikeln, bei der Fusion mit dem Golgi Apparat, bei der Bildung von COPI Vesikeln oder deren Fusion an der ER Membran. COPII Vesikel sind für den anterograden Transport zwischen ER und Golgi notwendig, COPI Vesikel für den retrograden Transport zwischen Golgi und ER (Abbildung 1) (Banfield et al., 1995; Campbell und Schekman, 1997; Graham und Emr, 1991; Lewis et al., 1997; Springer und Schekman, 1998).

Eines der bestuntersuchtesten Modellproteine mit dem sich die Transportvorgänge im sekretorischen System der Hefe verfolgen lassen ist die Carboxypeptidase yscY (CPY). Sie wird als Pre-pro-CPY im Zytosol gebildet und post-translational ins ER eingeschleust. Dort wird die

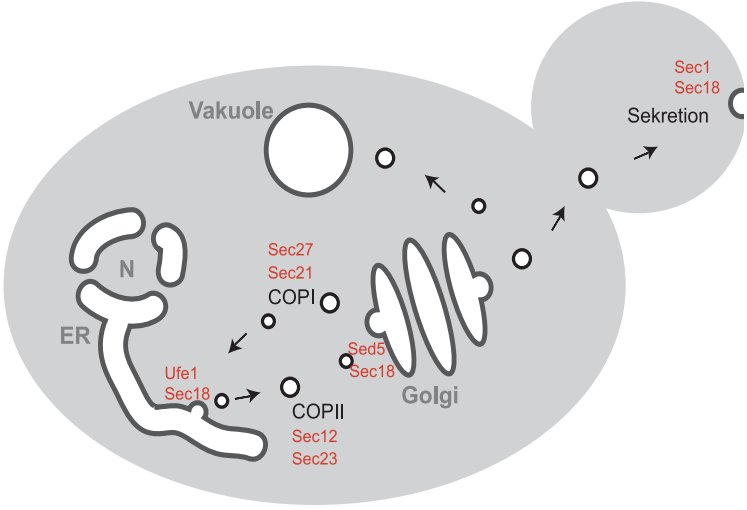


Abbildung 1: Modell des sekretorischen Systems. Sec12p und Sec23p sind bei der COPII-Vesikelbildung am ER beteiligt, Sed5p und Sec18p an der Fusion von COPII Vesikeln mit der Golgi-Membran, Sec21p und Sec27p an der Bildung von COPI Vesikeln und Ufe1p und Sec18p bei der Fusion von COPI Vesikeln mit der ER-Membran. Sec1p und Sec18p werden bei der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran benötigt.

Pre-Sequenz von dem Signalpeptidasekomplex abgeschnitten und die Peptidkette an vier Stellen N-glykosyliert. Das Molekulargewicht der ER-Form (p1CPY) beträgt 67 kDa. Nach der Faltung und dem Transport in den Golgi Apparat werden die Zuckerreste modifiziert und das Molekulargewicht steigt auf 69 kDa an (p2CPY). Vom Golgi wird CPY anschließend in die Vakuole transportiert und dort letztendlich zum reifen Enzym mit einem Molekulargewicht von 61 kDa prozessiert (mCPY). Durch Verfolgung der einzelnen Reifungsschritte über die Zeit kann der Transport durch das sekretorische System gemessen werden (Rendueles und Wolf, 1988; Van Den Hazel et al., 1996).

Eine weitere vakuoläre Protease mit der sich die Transportvorgänge durch das sekretorische System untersuchen lassen ist die Proteinase yscA (PrA), die von dem Gen *PEP4* kodiert wird. Auch diese Protease wird als inaktive Pre-pro-Form gebildet, die Signalsequenz wird im ER abgespalten und die Peptidkette an ein oder zwei Asparaginen N-glykosyliert. Nach dem Transport in die Vakuole wird sie entweder durch reife PrA oder Proteinase yscB (PrB) oder in einem autokatalytischen Schritt zum aktiven Enzym prozessiert. PrA kommt dadurch besondere Bedeutung zu, da es die Aktivierungskaskade in der Vakuole startet und zusammen mit der Proteinase yscB für den Hauptteil der proteolytischen Aktivität der Vakuole verantwortlich ist (Knop et al., 1993; Van Den Hazel et al., 1996).

Weitere Modellproteine zur Messung von Transportvorgängen im sekretorischen System sind z. B. Invertase, Cps1p oder Gas1p (Odorizzi et al., 1998; Schekman und Orci, 1996).

ATPasen der AAA-Familie

Proteine der AAA-Familie üben eine Vielzahl von Aktivitäten in der Zelle aus. Sie sind Chaperon ähnliche ATPasen, die an der Biogenese, der Funktion und der Dissasemblierung von Komplexen beteiligt sind. Die ausgeübten Aufgaben umfassen die Proteindegradation (ATPasen des Proteasoms, Cdc48p), die Membranfusion (Sec18p, Cdc48p) und weitere Aktivitäten wie Peroxisomen Biogenese, Bildung der mitotischen Spindel, Signal Transduktion und Transkription, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Allein in Hefe gibt es 21 Mitglieder der AAA-Familie (Neuwald et al., 1999).

Die ATPasen der AAA-Familie formen meist einen homo- oder heterotypischen Sechsring, der wahrscheinlich ein recht universell einsetzbares Motormodul bildet, das durch Adapterproteine für die jeweilige Aufgabe rekrutiert wird. Durch ATP Hydrolyse wird eine starke Konformationsänderung hervorgerufen, die durch Adaptermoleküle auf die verschiedenen Substrate übertragen werden könnte (Zhang et al., 2000). Einzelne Mitglieder können durch Binden an verschiedene Adaptormoleküle unterschiedliche Aktivitäten ausführen. Ein Beispiel hierfür ist das Hefeprotein Cdc48p bzw. ein Homologes aus höheren Eukaryoten p97 (Neuwald et al., 1999). Sie sind im Komplex mit Shp1p bzw. p47 an der homotypischen Membranfusion betei-

ligt, im Komplex mit Ufd1p und Npl4p jedoch an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Proteindegradation (Ghislain et al., 1996; Kondo et al., 1997; Latterich et al., 1995; Meyer et al., 2000; Rape et al., 2001).

Sec18p ist ein Hefeprotein der AAA-Familie das an mehreren Stellen in das sekretorische System eingreift (Graham und Emr, 1991). Es ist das Hefehomologe des Säugerproteins NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) und ist bei der Fusion von Vesikeln mit dem Zielorganell essenziell (Vale, 2000). Ein weiteres Beispiel für die universelle Einsetzbarkeit der AAA-Familie stellen die sechs ATPasen in der regulatorischen Untereinheit des Proteasoms dar. Das Proteasom dient dem geregelten Proteinabbau und die ATPasen übernehmen wahrscheinlich die Entfaltung und den Transport der Substrate in den zentralen Hohlraum des Proteasoms (Neuwald et al., 1999; Vale, 2000).

Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum

Proteine, die ihren Bestimmungsort im sekretorischen System haben, werden im Zytosol synthetisiert und ins ER eingeschleust. Der Transport ins ER erfolgt aufgrund einer N-terminalen Signalsequenz, die das Protein während oder nach der Synthese zum ER dirigiert. Im ER wird je nach Aminosäuresequenz die Signalsequenz gegebenenfalls abgespalten und die Peptidkette an Glykosylierungsstellen mit Zuckerresten modifiziert. Anschließend faltet sich das Protein mit Hilfe von Helferproteinen, sog. Chaperonen.

Die Qualitätskontrolle überwacht diese Vorgänge und sorgt dafür, dass nur richtig gefaltete und modifizierte Proteine an ihren Bestimmungsort im sekretorischen System gelangen. Proteine, die zum Abbau bestimmt sind, werden aus dem ER ins Zytosol transportiert und dort vom Ubiquitin-Proteasom-System zerstört. Die Qualitätskontrolle schützt vor den negativen Auswirkungen, die ungefaltete Proteine oder unvollständige Komplexe im sekretorischen System hervorrufen können (Bonifacino und Weissman, 1998; Kopito, 1997; Plemper und Wolf, 1999).

Beim Menschen steht die Ausbildung schwerer Krankheiten in Zusammenhang mit der Qualitätskontrolle im ER, Beispiele sind Mucoviscidose, spongiforme Enzephalopathie oder Wilsons Krankheit. Außerdem benützen bakterielle Toxine, wie Cholera oder Shiga Toxin, ERAD um vom ER ins Zytosol zu gelangen (Kostova und Wolf, 2002; Ma und Lindquist, 2001; Plemper und Wolf, 1999). Auch Viren, wie das Zytomegalovirus und HIV-1, nützen die Qualitätskontrolle aus, um Proteine abbauen zu lassen, die zur Stimulation der Immunantwort nötig sind und die Zellen als Virus-befallen markieren würden (Kostova und Wolf, 2002; Sommer et al., 2001).

Die Qualitätskontrolle des ER lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: 1) Erkennung ungefalteter Proteine und überzähliger Komplexuntereinheiten; 2) Zurückhaltung dieser Proteine im ER; 3) Transport zum Abbausystem; 4) Abbau.

Erkennung missgefalteter Proteine

Wie die Erkennung von falsch gefalteten Proteinen abläuft, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Qualitätskontrolle erkennt strukturelle Veränderungen in Proteinen, z. B. die Präsentation von hydrophoben Bereichen an der Proteinoberfläche. Funktionsüberprüfungen der Proteine sind im ER nicht möglich, da bei vielen Proteinen notwendige Modifizierungen oder Prozessierungsschritte fehlen. Die Qualitätskontrolle sortiert deshalb auch Proteine aus, die Mutationen tragen aber funktionell wären. Gezeigt werden konnte dies anhand von Beispielen aus Säugerzellen: Bestimmte Mutationen im Trypsininhibitor α1-Antitrypsin führen nicht zu einem Funktionsverlust, aber die Änderungen in der Struktur werden erkannt und die Proteine als falsch gefaltet dem Abbau zugeführt (Perlmutter, 1996). Ein weiteres Beispiel ist die ΔF508 Mutation in CFTR, die häufigste Ursache für das Auftreten von Mucoviscidose beim Menschen. Das Protein wäre funktionell, aber es wird im ER zurückgehalten und über ERAD abgebaut (Chang et al., 1999). Auch Proteine, die sich langsam falten, werden teilweise durch die Qualitätskontrolle im ER dem Abbau zugeführt; so verlässt nur ca. 30% des synthetisierten CFTR das ER und wird zur Plasmamembran transportiert, der Rest wird vom ER zurück ins Zytosol transportiert und durch das Proteasom abgebaut (Bebok et al., 1998).

Der Zeitraum, der einer Peptidkette zur Faltung zur Verfügung steht, wird bei Glykoproteinen wahrscheinlich durch die Modifizierung der Zuckerreste bestimmt. Ist die Prozessierung der Zuckerreste abgeschlossen und die native Struktur nicht erreicht, werden Glykoproteine dem Abbau zugeführt. Die Zuckerreste werden als $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ Struktur auf die Polypeptidkette übertragen. Danach werden zuerst die drei Glukosereste und dann der innere Mannoserest abgeschnitten. Ist das Protein nach der Prozessierung des inneren Mannoserestes noch nicht richtig gefaltet, d. h. bindet das Protein nach Erreichen der $Man_8GlcNAc_2$ Zuckerstruktur immer noch an Chaperone, dann wird das Protein dem Abbau zugeführt (Helenius und Aebi, 2001).

In Säugerzellen existiert der Calnexin/Calretikulin-Zyklus, der Glykoproteine bei der Faltung unterstützt. Nach dem Transfer des $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ Zuckerrestes auf das Polypeptid wird es durch die Glukosidasen I und II zu einer $GlcMan_9GlcNAc_2$ Struktur prozessiert. Diese Zuckerstruktur wird von den Lektinen Calnexin und Calretikulin gebunden und dadurch erhält auch Erp57, das mit Calnexin und Calretikulin interagiert, die Gelegenheit Disulfidbrücken im Protein zu verknüpfen. Calnexin und Calretikulin erhöhen die Faltungseffizienz eines Proteins und halten es im ER zurück. Nachdem Glukosidase II den letzten Glukoserest abgespalten hat, löst sich das Protein von Calnexin/Calretikulin ab, da die $Man_9GlcNAc_2$–Zuckerstruktur nicht von diesen Lektinen gebunden wird. Das freigesetzte Protein wird von Glukosyltransferase (GT) reglykosyliert, wenn es teilweise gefaltet ist. GT bindet weder an komplett ungefaltete noch an fertig gefaltete Proteine. Es ist also in der Lage, den Faltungszustand eines Proteins zu erkennen. Nach der Re-Glykosylierung durch GT kann das Faltungsintermediat wieder von Calnexin/Calretikulin gebunden werden, bis Glucosidase den Zuckerrest entfernt hat.

Aus diesem Zyklus gibt es zwei Ausgänge: 1. Das Protein ist korrekt gefaltet und wird nicht mehr von GT oder Calnexin/Calretikulin gebunden. Der innere Mannoserest wird von Mannosidase I abgespalten und die Modifizierung und Faltung im ER ist beendet. Sekretorische Proteine werden daraufhin zum Golgi transportiert. 2. Der innere Mannoserest wird durch das langsam arbeitende Enzym Mannosidase I abgespalten, bevor das Protein seine Faltung beendet hat. Nach der Prozessierung dieses Mannoserestes ist es kein Substrat mehr für den Calnexin/ Calretikulin-Zyklus und wird dem Abbau zugeführt. Die Aktivität von Mannosidase I gibt also die Zeit vor, die einem Protein zur Faltung zur Verfügung steht. (Helenius und Aebi, 2001).

In Säuger- sowie in Hefezellen wurden vor kurzem Lektine identifiziert, die eine Rolle beim Erkennen falsch gefalteter Glykoproteine spielen könnten (Braakman, 2001). Die beiden homologen Lektine EDEM aus Maus und Htm1p aus Hefe sind am Abbau von falsch gefalteten Glykoproteinen aus dem ER beteiligt und binden wahrscheinlich an die Zuckerstruktur $Man_8GlcNAc_2$ (Jakob et al., 2001; Nakatsukasa et al., 2001). Glykosylierte Abbausubstrate, bei denen die Zuckerstruktur von $Man_8GlcNAc_2$ abweicht, werden verlangsamt degradiert (Jakob et al., 1998; Knop et al., 1996b). Einen Überblick über den Calnexin/Calretikulin-Zyklus gibt Abbildung 2.

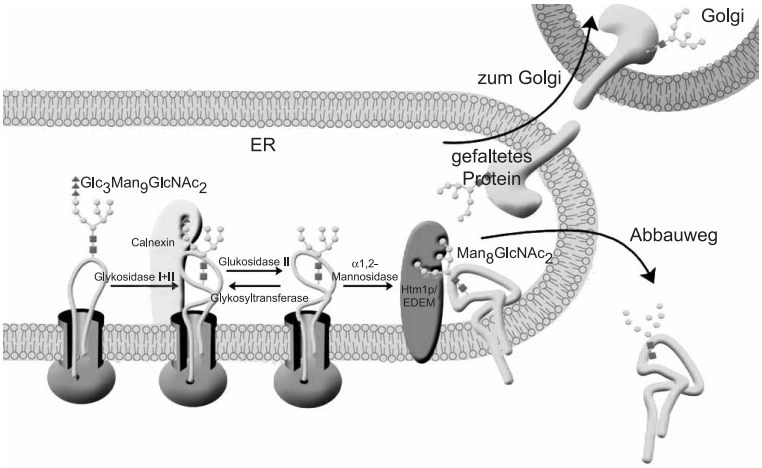


Abbildung 2: Modell des Calnexin/ Calretikulin-Zyklus (Braakman, 2001).

Ob es in Hefe ein vergleichbares System wie den Calnexin/Calretikulin-Zyklus gibt ist nicht bekannt, bisher ist noch kein homologes Protein zu GT in Hefe identifiziert (Kostova und Wolf, 2002).

Zurückhaltung

Nach dem Transport der Proteine ins ER beginnt der Faltungsprozess. Dieser wird durch Chaperone (Faltungshelfer) unterstützt. Beispiele aus Hefe sind Kar2p, Calnexin und Protein-Disulfid-Isomerasen. Diese Proteine helfen aber nicht nur bei der Faltung, sie tragen auch zur Zurückhaltung ungefalteter Proteine im ER bei. Sie binden an hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche, die sich bei richtig gefalteten Proteinen im Inneren befinden. Bestimmte

Rückhaltemotive in den Chaperonen bewirken den Rücktransport der Proteine aus dem Golgi ins ER, indirekt werden dadurch auch missgefaltete Proteine im ER gehalten, die selber keine Rückhaltesequenz besitzen (Ellgaard et al., 1999).

Chaperone spielen aber nicht nur bei der Zurückhaltung eine Rolle, sie schützen auch lösliche, ungefaltete Proteine vor der Bildung von Aggregaten im ER. Eines der wichtigsten Chaperone des ER, das bei diesem Prozess eine Rolle spielt, ist Kar2p mit seinen beiden Bindungspartnern Scj1p und Jem1p. Sie halten die Substrate in einem löslichen Zustand, der den Transport ins Zytosol ermöglicht (Nishikawa et al., 2001). Die Aktivität dieser Chaperone ist von der Calcium-Konzentration im ER abhängig. Wird die Konzentration durch Ausschalten der Calciumionen-Pumpe Pmr1p verändert ist auch der Abbau von löslichen, ungefalteten Substraten gestört (Dürr et al., 1998). Bei der Degradation missgefalteter Membranproteine wie Pdr5*, die zum Abbau keine Kar2p Aktivität benötigen (Plemper et al., 1998), hat die Pmr1p Aktivität keinen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit (Kostova und Wolf, 2002).

Die Zurückhaltung von überzähligen Komplexuntereinheiten im ER wird teilweise durch spezifische Zurückhaltemotive erreicht. Diese werden in nicht vollständig assemblierten Komplexen an der Oberfläche präsentiert und halten den Teilkomplex im ER zurück. Ist der Komplex vollständig assembliert, verschwinden die Zurückhaltemotive im Inneren des Komplexes und der Transport aus dem ER wird möglich (Letourneur et al., 1995; Stevens et al., 1994).

Rücktransport ins Zytosol

Als missgefaltet erkannte Proteine werden zurück zum Translokon gebracht und durch den Sec61 Kanal, der auch für den Import benutzt wird, wieder aus dem ER heraustransportiert (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997; Wiertz et al., 1996; Zhou und Schekman, 1999). In Hefe konnte gezeigt werden, dass die Proteine nach dem Import nicht bis zur vollständigen Faltung mit dem Kanal in Verbindung bleiben, sondern vollständig ins ER importiert werden. Eine an den C-Terminus von CPY* angefügte fünfte Glykosylierungsstelle wird mit einem Zuckerrest modifiziert. Dies beweist, dass das Protein ganz ins ER transportiert wird und eine Maschinerie existiert, die den Rücktransport von ungefalteten Proteinen initiieren kann (Plemper et al., 1999b). Ein weiteres Beispiel sind Bakterientoxine wie das Choleratoxin. Sie werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, durch das sekretorische System ins ER transportiert und benützen ERAD um durch das Translokon ins Zytosol zu gelangen (Sommer et al., 2001). Proteine werden für den Transport ins Zytosol vermutlich an spezielle Retro-Translokons gebracht, bei denen zusätzliche Proteine am Sec61-Kanal den Export ermöglichen (Plemper et al., 1999a; Plemper et al., 1999b).

Die Herkunft der treibenden Kraft für die Retrotranslokation ist bisher ungeklärt, es wird vermutet, dass Polyubiquitinierung, die ATPasen des 26S Proteasoms oder zytosolische Chaperone die Kraft für den Transport durch das Sec61 Translokon liefern könnten (Biederer et al., 1997; Sommer und Wolf, 1997). Für verschiedene polytope Membranproteine (CFTR, über-

zähliges Vph1p) ist bekannt, dass sie für den Abbau zytosolische Chaperone der Hsp70-Familie benötigen (Hill und Cooper, 2000; Meacham et al., 2001; Zhang et al., 2001). Der Abbau löslicher Substrate ist unabhängig von zytosolischen Hsp70 Chaperonen (Brodsky et al., 1999). Im Fall von CFTR wird die Ubiquitin-Ligase, die den Abbau von CFTR vermittelt, von einem Komplex aus Hsp70 und dem Protein CHIP gebildet (Meacham et al., 2001). Daher ist es unwahrscheinlich, dass sie analog zu Kar2p beim Import ins ER (Matlack et al., 1999) als treibende Kraft für den Export wirken. Wahrscheinlich werden sie bei der Entfaltung zytosolischer Domänen gebraucht (Hill und Cooper, 2000) oder erkennen ungefaltete zytosolische Bereiche und initiieren dann den Abbau dieser Proteine (Meacham et al., 2001).

Abbau

Der Abbau ungefalteter Proteine findet durch das Ubiquitin-Proteasom-System im Zytosol statt (Biederer et al., 1996; Hiller et al., 1996; Jensen et al., 1995; Ward et al., 1995). Dieses System besteht aus zwei Teilen, dem Ubiquitin-System, das Proteine zum Abbau markiert und dem Proteasom, das die markierten Proteine abbaut (Hershko und Ciechanover, 1998).

Das zur Markierung verwendete Ubiquitin ist ein kleines Protein aus 76 Aminosäuren. Es wird in 3 Schritten auf das Substratmolekül übertragen. Im ersten Schritt wird Ubiquitin aktiviert, hierzu wird eine Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin-Aktivierenden-Enzym (E1) und Ubiquitin gebildet. Anschließend wird es im zweiten Schritt kovalent an ein Ubiquitin-Übertragendes Enzym (E2) gebunden und im dritten Schritt mithilfe einer Ubiquitin-Ligase (E3) unter Ausbildung einer Isopeptidbindung mit dem Substratprotein verknüpft. Es wird die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes im Substrat mit dem C-terminalen Glycin des Ubiquitin-Moleküls verbunden. Möglich ist aber auch die Übertragung von Ubiquitin auf den N-Terminus des Substrates. Anschließend werden weitere Ubiquitinmoleküle angeheftet, vor allem an den Lysinrest an Position 48 in Ubiquitin und das Substrat dadurch mit einer Polyubiquitinkette zum Abbau markiert (Hershko und Ciechanover, 1998; Sommer et al., 2001).

Ubiquitin-Markierung dient nicht immer nur zum Abbau, in bestimmten Fällen wird das Protein vom Proteasom nur prozessiert. Des Weiteren kann auch die Lokalisation oder Aktivität eines Proteins durch Ubiquitinierung beeinflusst werden (Finley, 2001).

Das 26S Proteasom ist aus einem 20S Zylinder, der die aktiven Zentren beherbergt und ein bis zwei angesetzten regulatorischen Kappen zusammengesetzt. Der Zylinder wird von 4 übereinander gestapelten Ringen aus 7 Untereinheiten gebildet. Die Ringe bestehen entweder aus α- oder β- Untereinheiten und sind in einer $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$-Struktur mit zentralem Hohlraum angeordnet. Die aktiven Zentren werden von den β-Untereinheiten gebildet. In Eukaryonten sind 6 der 14 β-Untereinheiten aktiv. Die Kappen, die unter anderem 6 ATPasen der AAA-Familie enthalten, dienen der Erkennung und Entfaltung polyubiquitinierter Substrate. Nach Abschneiden der Polyubiquitinkette erfolgt der Transport der entfalteten Polypeptidkette ins Innere des 20S Zylinders, in dem der Abbau stattfindet (Glickman et al., 2000; Heinemeyer, 2000).

In Hefe ist der Mechanismus der Polyubiquitinierung und des Abbaus von ERAD-Substraten schon recht gut untersucht. Für die Aktivierung von Ubiquitin wird das Enzym Uba1p gebraucht (Sommer et al., 2001). Die benötigten E2 Proteine sind Ubc1p, Ubc4p, Ubc5p, Ubc6p und Ubc7p (Biederer et al., 1996; Friedländer et al., 2000; Hiller et al., 1996; Hill und Cooper, 2000; Sommer und Jentsch, 1993). Ubc6p ist in der ER-Membran lokalisiert, es besitzt einen C-termialen Membrananker und das aktive Zentrum ist zum Zytosol hin ausgerichtet (Sommer und Jentsch, 1993; Walter et al., 2001). Ubc7p wird durch Cue1p an die ER Membran gebunden (Biederer et al., 1997). Ubc1p und Ubc7p interagieren mit dem E3 Protein Der3/Hrd1p, Ubc6p mit dem E3 Ssm4/Doa10p. Diese beiden E3 Proteine sind in der ER Membran lokalisiert, ihre aktiven Zentren befinden sich im Zytosol. Zusammen mit den E2 Enzymen sind sie für die Polyubiquitinierung verschiedener ERAD-Substratproteine zuständig, Der3/Hrd1p ist unter anderem für den Abbau von CPY* und HmgCoA-Reduktase nötig, Ssm4/Doa10p für Ubc6p (Bays et al., 2001a; Bordallo et al., 1998; Deak und Wolf, 2001; Swanson et al., 2001). Ubc4p und Ubc5p werden für den Abbau von überzähligem Vph1p benötigt. Ein E3, das den Abbau von Vph1 vermittelt, ist bisher noch nicht identifiziert worden (Hill und Cooper, 2000).

Zur Funktion von Der3/Hrd1p ist außerdem noch die Anwesenheit des Komplexpartners Hrd3p nötig, ansonsten wird Der3/Hrd1p abgebaut (Bays et al., 2001a; Plemper et al., 1999a). Zur Stabilisierung von Der3/Hrd1p tragen die Transmembrandomäne und der lumenale Teil von Hrd3p bei (Gardner et al., 2000). Bisher ungeklärt ist, ob die im lumenalen Teil von Hrd3p vorhandenen TPR-Motive („tetratricopeptide repeat“) nur zur Interaktion mit Der3/Hrd1p dienen, oder ob Hrd3p noch weitere Bindungspartner besitzt. TPR-Motive sind weit verbreitet und dienen der Protein-Protein Interaktion (Blatch und Lassle, 1999). Die TPR-Motive in Hsp70-Cofaktoren binden die C-terminale EEVD-Aminosäuresequenz der zytosolischen Hsp70 Chaperone (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Analog könnte vielleicht auch Kar2p an Hrd3p binden (Ponting, 2000).

Vor dem Abbau im Proteasom werden glykosylierte Substrate möglicherweise noch deglykosyliert, wahrscheinlich von dem Enzym Png1p. In Hefe konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen des zytosolisch lokalisierten Proteins Png1p CPY* langsamer abgebaut wird (Suzuki et al., 2000).

Der Abbau der Substrate im Proteasom erfolgt vermutlich an der Außenseite der ER Membran. Das Proteasom könnte durch Interaktion mit Membranproteinen oder durch Binden der polyubiquitinierten Substrate an die ER Membran dirigiert werden (Sommer et al., 2001). Inzwischen gibt es eine Vielzahl von bekannten ERAD Substraten, davon stammen viele Beispiele aus dem Menschen und sind mit der Auslösung schwerer Krankheiten verbunden. Einen Überblick bietet der Übersichtsartikel von Kostova und Wolf, 2002.

Die „Unfolded Protein Response“ (UPR)

Wenn der Abbau ungefalteter Proteine gehemmt ist oder ER-Funktionen wie Glykosylierung oder Disulfidbrückenbildung nicht funktionieren, akkumulieren diese Proteine im ER. Um die ER Funktionen aufrecht zu erhalten, wird deshalb eine Antwort auf ungefaltete Proteine (im Englischen unfolded protein response: UPR) ausgelöst (Chapman et al., 1998). Bei ansteigender Menge an ungefalteten Proteinen im ER bindet das Chaperon Kar2p ungefaltete Proteine anstatt Ire1p. Daraufhin oligomerisiert Ire1p und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Zusammen mit der tRNA-Ligase Rlg1p spleißt Ire1p die mRNA von *HAC1* zur gereiften Form. Dies löst die Bildung des Transkriptionsfaktors Hac1p aus und ermöglicht die Transkription der Proteine, die das ER vor ungefalteten Proteinen schützen (Friedländer et al., 2000; Travers et al., 2000). Dadurch wird die Expression von über 300 Proteinen aktiviert, diese erfüllen verschiedene Aufgaben in der Zelle, z. B. in der ER Qualitätskontrolle, als Chaperone, in der Lipidsynthese, dem Transport durch das sekretorische System oder in der Glykosylierung. Eines der am stärksten exprimierten Proteine ist das Protein Der1p (Friedländer et al., 2000; Travers et al., 2000). Der1p ist an der ER Membran lokalisiert, es ist essenziell für den Abbau der Modellsubstrate CPY* und PrA*, aber es wurde bisher noch keine eindeutige Funktion gefunden (Knop et al., 1996a).

Defekte im Abbau von missgefalteten Proteinen aus dem ER oder in der Aktivierung der UPR sind einzeln für Hefezellen ohne Folgen. Kombiniert man allerdings beide Defekte und stresst die Zellen noch zusätzlich durch Temperatur, Glykosylierungsinhibitoren oder reduzierende Agentien, sterben die Zellen (Casagrande et al., 2000; Friedländer et al., 2000; Ng et al., 2000).

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es Näheres zum Ablauf der Qualitätskontrolle im ER herauszufinden. Es gibt große Unterschiede im Abbaumechanismus von löslichen und Membran-gebundenen Substraten, aber keine direkt vergleichbaren Abbausubstrate. Daher sollte der Abbau verschiedener Modellsubstrate mit der gleichen Abbaudeterminante aber zusätzlichen Transmembran- und Zytosolischen- Domänen verglichen werden. Dabei sollte auch geprüft werden, ob neben dem Proteasom noch weitere zytosolische Faktoren am Abbau von löslichen Proteinen und Membranproteinen beteiligt sind. Vor allem sollte der Einfluss der AAA-ATPase Cdc48p auf die Degradation von ungefalteten Proteinen aus dem ER näher untersucht werden. Eine weitere Aufgabe war es die Morphologie von Zellen zu untersuchen, die Defekte in ERAD aufweisen.

Material und Methoden

Bezugsquellen von Chemikalien und Geräten

Chemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig: [^{35}S]-Methionin, ECL™-System, Nylonmembran

Boehringer-Mannheim, Mannheim: Nukleotide, Restriktionsendonukleasen, Ligasen, Polymerasen, Complete™ Inhibitor-Cocktail, Pefabloc SC, DNA-Längenstandards,

Difco, Detroit, USA: alle Bestandteile von Medien für Zellkulturen

Invitrogen: SeeBlue™ Molekulargewichtsmarker

NEB, USA: Restriktionsendonukleasen Polymerasen

Pall Corporation: Nitrozellulosemembran Biotrace™ NT 0,45 µm

Pharmacia, Freiburg: Protein A-Sepharose Cl-4B

Schleicher und Schuell, Dassel: Nitrozellulose PH75, Blottingpapiere GB001, GB002, GB003

Seigagaku Kyogo, Tokyo, Japan: Zymolyase 100-T

Sigma, Deisenhofen: Poly-L-Lysin

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

Geräte

Amersham-Pharmacia: Detektionsscreens

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifugen

Heraeus: Tischzentrifugen

Jasco, Tokyo: Spektrometer für Protein- und DNA-Konzentrationsmessungen, enzymatische Tests und Bestimmung der optischen Dichte von Zellkulturen

Kontron, München: Kühlzentrifugen

Molecular Probes: PhosphpoImager

Phillips: Elektronenmikroskop

Zeiss, Oberkochen: Axioskop, Filtersets: 487914 für GFP-, 487901 für Hoechst-Farbstoff 33342-Beobachtung

Antikörper

Kaninchen αCPY; Finger et al., 1993

Kaninchen αPrA; Finger et al., 1993

Kaninchen αCdc48p; Madeo et al., 1998

Kaninchen αSec61p; Biederer et al., 1996

Kaninchen αKar2p; Rose et al., 1989

Kaninchen αEmp47p; Schröder et al., 1995

Kaninchen αAPI; Epple et al., 2001

Maus αHA; Babco (HA.11), USA; Boehringer-Mannheim (12CA5), Mannheim

Maus αGFP; Clontech

Maus αCPY; Dianova, Hamburg

Ziege αMaus IgG, HRPO konjugiert; Dianova, Hamburg

Kaninchen αMaus, HRPO konjugiert; Sigma

αMaus-Immuno-Gold Komplexe (12 nm); Dianova, Hamburg

***Saccharomyces cerevisiae*-Stämme**

W303-1B	*Mat α ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*	Chiang und Schekman, 1991
W303-1C	W303-1B *prc1-1*	Knop et al., 1996a
YRP134	W303-1C diploider Hefestamm	R. Plemper
WCGY4a	*Mat a his3-11,15 leu2-3,112 ura3 can GAL prc1-1*	Hiller et al., 1996
YHIY29/14	WCGY4a *pre1-1 pre4-1*	Hiller et al., 1996
YCT458	*Mat a ura3-52 prc1-1*	diese Arbeit
YCT437	*Mat a his4 lys2 ura3 leu2 bar1 prc1-1*	diese Arbeit
YCT438	YCT437 *LYS2 sec27-1*	diese Arbeit
YCT614	YCT437 *LYS2 sec27-1 Δpep4::URA3*	diese Arbeit
YPD20	*Mat a ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 lys2 trp1-1 prc1-1*	Deak, 2001
YPD21	YPD20 *Δssa2::LEU2 Δssa3::TRP1 Δssa4::LYS2*	Deak, 2001
YPD22	YPD20 *ssa1-45 Δssa2::LEU2 Δssa3::TRP1 Δssa4::LYS2*	Deak, 2001
YCT397	*Mat a leu2-3,112 ura3-52 ade1-100 his4-519 prc1-1*	diese Arbeit
FY23	*Mat a ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63*	Hitchcock et al., 2001

PSY2340	FY23 *npl4-1*	Hitchcock et al., 2001
YFI98	*Mat a leu2-3,112 Δura3::LEU2 prc1-1 pra1ΔSS der4-1*	A. Finger
YFI163	*Mat a leu2-3,112 Δura3::LEU2 prc1-1 pra1ΔSS der6-1*	A. Finger
YFI277	*Mat a leu2-3,112 Δura3::LEU2 prc1-1 pra1ΔSS der7-1*	A. Finger
	W303-1B Derivate:	
W303-BD	*Mat α Δder1::URA3*	Knop et al., 1996a
W303 ΔC	*Mat α Δprc1::LEU2*	Plemper et al., 1999b
	W303-1C Derivate	
W303-CD	*Mat α Δder1::URA3*	Knop et al., 1996a
W303-CF	*Mat α Δpep4::TRP1*	Knop et al., 1996a
W303-CDF	*Mat α Δder1::URA3 Δpep4::TRP1*	Knop et al., 1996a
YRH68	*Mat α Δire1::LEU2*	R. Hitt
YRH79	*Mat α Δder1::URA3 Δire1::KAN^R*	R. Hitt
YJB009	*Mat α Δder3/hrd1::HIS3*	Bordallo et al., 1998
YCT431	*Mat α ufe1-1*	diese Arbeit
YCT441	*Mat α sec23-1*	diese Arbeit
YCT480	*Mat α sed5-1*	diese Arbeit
YCT542	*Mat α Δire1::LEU2 sec23-1*	diese Arbeit
YCT540	*Mat a Δire1::LEU2 ufe1-1*	diese Arbeit
YCT488	*Mat α prc1-1::HA$_3$::KAN^R*	diese Arbeit
YJB010	*Mat α cdc48::URA3 [2μ LEU2 P$_{GAL1}$::CDC48]*	J. Bordallo
YJB011	*Mat α cdc48::URA3 [2μ LEU2 P$_{GAL1}$::cdc48E]*	J. Bordallo
YJB012	*Mat α cdc48::URA3 [2μ LEU2 P$_{GAL1}$::cdc48F]*	J. Bordallo
YJB015	*Mat α cdc48::URA3 [2μ LEU2 P$_{GAL1}$::cdc48G]*	J. Bordallo
YCT549	*Mat α cdc48^{Y834E}::KAN^R*	diese Arbeit
YCT511	*Mat a Δubc1::HIS3*	diese Arbeit
YCT519	*Mat a Δubc1::HIS3 Δubc7::LEU2*	diese Arbeit
YPD5	*Mat α Δydj1::HIS3 ydj1-151::LEU2*	Deak, 2001
YRP86	*Mat α sec61-2*	Plemper et al., 1997
YRP160	*Mat α kar2-159*	Plemper et al., 1998
YRH25	*Mat α Δygl128::KAN^R*	R. Hitt
YCT595	*Mat α Δhdj1::KAN^R*	diese Arbeit
YCT598	*Mat α Δpr061::KAN^R*	diese Arbeit
YCT601	*Mat α Δygl128::KAN^R Δpr0611::KAN^R*	diese Arbeit

YCT603	*Mat a Δygl128::KAN^R Δhdj1::KAN^R*	diese Arbeit
YRP023	*Mat α Δpmr1::HIS3*	Dürr et al., 1998
	YCT458 Derivate:	
YCT462	*Mat a sec12-1*	diese Arbeit
YCT460	*Mat α sec18-1*	diese Arbeit
YCT611	*Mat a sec21-1*	diese Arbeit
YCT482	*Mat a/α SEC18/sec18-1*	diese Arbeit
YCT507	*Mat α Δsed4::KAN^R*	diese Arbeit
YCT513	*Mat α sec12-1 Δsed4::KAN^R*	diese Arbeit
	YCT397 Derivate:	
YCT415	*Mat a ufd1-1*	diese Arbeit
YCT354	*Mat a ufd2-1*	diese Arbeit
YCT420	*Mat a ufd3-1*	diese Arbeit
YCT357	*Mat a ufd4-1*	diese Arbeit
YCT355	*Mat a ufd5-1*	diese Arbeit

Escherichia coli Stämme

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden die *E. coli* Stämme DH5α und JM110 verwendet.

DH5α	F´/endA1 hsdR17($r_{k-}m_{k+}$) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal_r) relA1 Δ(lacZYA-argF)$_{U169}$ (Φ80lacZΔM15)	Hanahan, 1983
JM110	F´ traD36 lacI^q Δ(lacZ) M15 proA$^+$B$^+$/rpsL (Str^r) thr leu thi lacY galK galT ara fhnA dam dcm glnV44 Δ(lac- proAB)	New England Biolabs

Vektoren

pBluescriptIIKS+	Vektor für *E. coli* (amp^r) T3, T7 Promotor	Stratagene
pRS306	*URA3* Vektor für Hefe und *E. coli* (amp^r)	Sikorski und Hieter, 1989
pRS313	*CEN HIS3* Vektor für Hefe und *E. coli* (amp^r)	Sikorski und Hieter, 1989
pRS315	*CEN LEU2* Vektor für Hefe und *E. coli* (amp^r)	Sikorski und Hieter, 1989
pRS316	*CEN URA3* Vektor für Hefe und *E. coli* (amp^r)	Sikorski und Hieter, 1989
pRS423	*2μ HIS3* Vektor für Hefe und *E. coli* (amp^r)	Christianson et al., 1992
pRS426	*2μ URA3* Vektor für Hefe und *E. coli* (amp^r)	Christianson et al., 1992

pUFE315	*pRS315 UFE1*	Lewis und Pelham, 1996
pUT1	*pRS315 ufe1-1*	Lewis und Pelham, 1996
pBR545	*CEN URA3* Genbankplasmid mit *CDC48*	Fröhlich et al., 1991
pTX190	*CEN URA3* P_{CUP1}*::prc1-1*	Friedländer et al., 2000
pTX191	*CEN HIS3* P_{CUP1}*::prc1-1*	Friedländer et al., 2000
PHGpd/p82	*2µ HIS3* P_{TDH3}*::HSC82*	Nathan und Lindquist, 1995
pFA6a-kanMX6	*E. coli* Plasmid mit *(kan^r)*	Longtine et al., 1998
pFA6a-3HA-kanMX6	*E. coli* Plasmid mit Tripel HA tag und *(kan^r)*	Longtine et al., 1998
pFA6a-GFP-kanMX6	*E. coli* Plasmid mit GFP tag und *(kan^r)*	Longtine et al., 1998
pRS306*prc1-1*	*URA3 prc1-1*	Knop et al., 1996a
pWO152	*2µ URA3 SEC18*	M. Hiller
pMA1	*CEN URA3 HIS3* P_{TDH3}*::prc1-1::pdr5*$_{4332-4532}$*::GFP*	M. Lokhova

Synthetische Oligonukleotide

CPYPCRR1: 5'GTAGCTGATAATAAAAACGGTATGCCTACACATACACGCTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC3'

CPYPCRF2: 5'AAGTATGGTTAACGAATGGATCCACGGTGGTTTCTCCTTACGGATCCCCGGGTTAATTAA3'

CDC48EF3:5'GCTGCATTTGGTTCTAATGCGGAGGAAGATGATGATTTGGAGAGTTGAGGCGCGCCACTTCTAAA3'

CDC48R1:5'TGAATTTACGATTTAAAATAAAAATATACCTGGCATATAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC3'

Sed4R1: 5' TTTTTTCTCTCCTTTTAAACTTAGAAAAACTAGCATAATACAGCTGAAGCTTCGTACGC3'

Sed4F2: 5' TCACAATTCGTCATGAAGGCCAGCGTAGTTTACGGTTCCTGCTAGGCCACTAGTGGATCTG3'

Yer48down: 5'GGACGCGTATTGTAGTTC3'

Yer48up: 5'ATCCTGAATGTTCTCTCC3'

Ymr161down: 5'GGCTTGATTACTTTCGGT3'

Ymr161up: 5'TGATTACACATTGCCTCC3'

Ypr61down: 5'CTGAAGGACATGTGGCG3'

Ypr61up: 5'AACTACCGAAGTAGAGAC3'

Prc1tmtrunc1:5'CCTAAAAAGAACGGTAAACTCTCCAAGAAATAAGGCGCGCCACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGA3'

Prc1tmtrunc2:5'TCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGCCTTATTTCTTGGAGAGTTTACCGTTCTTTTTAGG3'

Molekularbiologische Methoden und Plasmidkonstruktionen

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

Das *ufe1-1* Integrationsplasmid pCT27 wurde durch Ligation eines 1,5kB großen SalI/SpeI Fragmentes aus pUT1 (Lewis et al., 1997) in mit den gleichen Enzymen geöffneten pRS306 erhalten.

Zur Expression von CPY*-HA unter der Kontrolle verschiedener Promotoren (*PRC1, TDH3* und *CUP1*) wurden in den entsprechenden Plasmiden die C-Termini der *prc1-1* Gene und Teile der Terminatorregionen entfernt und die so geöffneten Vektoren in einen CPY*-HA exprimierenden Hefestamm transformiert. Durch „gap-repair“ wurden die gewünschten Plasmide nach „Plasmid rescue“ in *E. coli* erhalten. Die SnaBI geschnittenen Plasmide pHIT341 und pTX190 und die CelII/StyI geschnittenen Plasmide pCT41 und pTX191 wurden in Stamm YCT488 transformiert und *prc1-1::HA*$_3$*::KAN*^{R} in den Plasmiden pCT40 (*PRC1*-Promotor), pCT51 (*CUP1*-Promotor), pCT43 (*TDH3*-Promotor) und pCT52 (*CUP1*-Promotor) erhalten. Der Vektor mit *TDH3* Promotor in pRS313 (pCT39) wurde durch Entfernen des *HSP82* Gens aus Plasmid pHGpd/82 erhalten. pHGpd/p82 (Nathan und Lindquist, 1995) wurde mit BamHI geöffnet, das 5,6kB große DNA Stück isoliert und anschließend religiert. Für die Expression von *prc1-1* unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors wurde Vektor pCT39 mit Ecl136II geöffnet und mit dem 2,1kB *prc1-1* Fragment aus BstZ17I/SmaI geschnittenem Vektor pHIT341 ligiert. Das Ergebnis war Plasmid pCT41.

Um CPY*-HA unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors zu exprimieren und den Auxotrophiemarker *URA3* verwenden zu können, wurde pCT42 aus den Bsu36II/XhoI verdauten Plasmiden pCT40 und pCT41 zusammengesetzt. Das 1,4kB große Fragment aus pCT41 mit dem *TDH3* Promotor und Teilen des *prc1-1* Gens wurde mit dem 8,1kB großen Fragment aus pCT40 ligiert.

Um chromosomale DNA aus der Umgebung des *CDC48* Gens aus dem Plasmid pBR454 zu entfernen, wurde es mit HindIII geöffnet, das 12,7 kB große Fragment isoliert und zu Vektor pCT48 religiert.

Zur Überexpression von *SEC18* wurde Plasmid pWO152 mit BamHI und HindIII geöffnet, das 3kB große *SEC18* Fragment isoliert und in mit denselben Enzymen geöffneten Vektor pRS426 ligiert (pCT49).

Um das zytosolische GFP-Epitop aus dem CTG* Fusionsprotein zu entfernen, wurde pMA1 mit PacI und AscI geschnitten und das 8,9kB Fragment zusammen mit den beiden gepaarten Oligonukleotiden Prc1tmtrunc1und Prc1tmtrunc2 *in vivo* in Hefestamm W303-1C ligiert. Dadurch wurde das Plasmid pCT67 erhalten, das in Hefe das CT* (P_{TDH3}::*prc1-1*::$pdr5_{4332-4535}$) Fusionsprotein exprimiert.

Um die Plasmide pCT68 und pCT69 zu erhalten, wurde das *prc1-1* Allel in den Vektoren pMA1 und pCT67 durch das *PRC1* Allel ersetzt. Dies wurden durch verdau von pMA1 und pCT67 mit AspI und Bsu36I und anschließendem „gap-repair“ in Stamm W303-1B erreicht.

Zur Expression von CPY unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors wurde NcoI/Bsu36I geschnittenes Plasmid pCT41 zum „gap-repair“ in W303-1B transformiert und pCT70 erhalten.

Wachstum und Konstruktion von Hefestämmen

Für die Aufzucht von Hefe- und *E. coli*-Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Ausubel, 1992; Guthrie, 1991; Sambrook et al., 1989). Hefestämme wurden nach der Lithiumacetat-Methode transformiert (Ito et al., 1983).

Zur Integration des *prc1-1* Allels in die Hefestämme YR1070 (WT), YR1068 (*sec12-1*), YR1069 (*sec18-1*) (H. Rudolph), RH448 (WT), RH2688 (*sec27-1*) (Schröder-Köhne et al., 1998), BWG1-7a (WT), PM373 (*ufd1-1*), PM211 (*ufd2-1*), PM164 (*ufd3-1*), PM642 (*ufd4-1*) und PM381 (*ufd5-1*) (Johnson et al., 1995) wurde die Zwei-Schritt-Genaustausch Methode nach Scherer angewendet (Scherer und Davis, 1979). Das Plasmid pRS306*prc1-1* wurde mit BglII verdaut und die DNA Fragmente in die entsprechenden Hefestämme transformiert. Es wurde auf Uracil-Prototrophie selektioniert und anschließend einige Klone über Nacht in YPD-Medium angezogen. Diese wurden auf 5-FOA-Medium ausplattiert und die wachsenden Klone auf CPY Aktivität untersucht (Guthrie, 1991). Klone ohne CPY Aktivität wurden im Western-Blot auf die Anwesenheit von CPY* getestet. Nach dieser Methode wurden die Hefestämme YCT458, YCT462, YCT460, YCT437, YCT438, YCT397, YCT415, YCT354, YCT420, YCT357 und YCT355 erhalten.

Die Hefestämme YCT441 (aus RSY281 (Kaiser und Schekman, 1990)), YCT480 (aus CBY263 (Cao et al., 1998)) und YCT611 (aus RSY277 (Letourneur et al., 1994)) wurden durch mehrmaliges Rückkreuzen mit einem Wildtypstamm passenden Paarungstyps (W303-1C oder YCT458) erhalten.

Die Hefestämme YCT513, YCT519, YCT540, YCT542, YCT600, YCT601 und YCT603 wurden aus Kreuzungen und Tetradendissektionen der entsprechenden Einzelmutantenstämme erhalten.

Um den Stamm YCT511 zu erhalten wurde der Stamm W303-1C mit HindII verdautem *UBC1* Disruptionsplasmid transformiert (Seufert et al., 1990) und die erhaltenen Klone durch Southern Blot überprüft.

Das C-Terminal mit Tripel-HA Epitop markierte *prc1-1::HA*$_3$-Allel wurde nach der Methode von Longtine (Longtine et al., 1998) erhalten. Von Plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 wurde mit den Oligonukleotiden CPYPCRF2 und CPYPCRR1 ein 1,9kB großes DNA Stück amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Stamm YRP134 transformiert und auf G418 Resistenz (200mg/l) selektioniert. Anschließend wurde der Stamm sporuliert und einer Tetradendissektion unterzogen. Das Resultat war der Stamm YCT488.

YCT549 wurde analog einer Methode zur C-terminalen Verkürzung von Genen nach (Longtine et al., 1998) hergestellt. Statt der Verkürzung des *CDC48* Lokus wurde jedoch das Codon für die Aminosäure Tyrosin an Position 834 so verändert, dass ein Codon für die Aminosäure Glutamat entsteht. Mit den Oligonukleotiden CDC48EF3 und CDC48R1 wurde von Plasmid pFA6a-GFP-kanMX6 ein 1,8kB großes DNA Stück vervielfältigt. Es wurde wie oben Beschrieben vorgegangen und der Stamm YCT549 erhalten. Zur Überprüfung der Mutation wurde *cdc48E* durch „gap-repair“ in das mit SnaBI und Bsu36I verdaute Plasmid pCT48 gerettet und dadurch pCT58 und pCT60 erhalten. Beide Plasmide wurden zum Sequenzieren gegeben. Dies bestätigte die Mutagenese zu *cdc48*^{Y834E} .

YCT614 wurde durch Transformation von mit PvuII verdautem Plasmid pWO139 in Stamm YCT438 erhalten. Die Uracil prototrophen Klone wurden im Western Blot auf AminopeptidaseI (API) Reifung hin untersucht, Klone ohne gereifte API einem Southern Blot unterzogen und damit die korrekte Zerstörung von *PEP4* nachgewiesen.

Die Disruption von *SED4* wurde nach M. Longtine (Longtine et al., 1998) in Stamm YCT482 durchgeführt und führte zu Stamm YCT507. Der diploide Stamm YCT482 stammt aus einer Kreuzung der Stämme YCT458 und YCT460.

Stamm YCT431 wurde nach der Zwei-Schritt-Genaustausch Methode nach Scherer (Scherer und Davis, 1979) mit SnaBI verdautem Plasmid pCT27 erhalten.

Für die Herstellung der Stämme YCT594, YCT595 und YCT598 wurde durch Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte mit den Oligonukleotiden Yer48up, Yer48down, Ymr161up, Ymr161down, Ypr61up und Ypr61down aus den Eurofan Deletions-Stämmen DNA gewonnen und in Stamm YRP134 transformiert. Nach Sporulation und Tetradendissektion wurden die Sporen durch PCR mit den Oligonukleotiden Yer48up, Yer48down, Ymr161up, Ymr161down, Ypr61up und Ypr61down auf vorhanden sein bzw. Zerstörung des Gens überprüft.

Biochemische Methoden

Immundetektion von Proteinen auf Western-Blots

Für den immunologischen Proteinnachweis wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) nach ihrer Größe aufgetrennt und durch Elektronentransfer auf Nitrozellulose Membran übertragen (Ausubel, 1992). Die Detektion von antigenem Material nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (ECL-Kit Amersham). Der Zellaufschluss wurde meist durch alkalische Lyse (Yaffe und Schatz, 1984) durchgeführt. Für die Membranextraktion und den Protease-Verdau wurden die Zellen durch Spheroblastieren (Egner et al., 1995) und Lysieren mit einem Homogenisator aufgeschlossen.

Cycloheximid Chase

Um den Abbau von instabilen Proteinen zu untersuchen, wurde zu logarithmisch wachsenden Zellen Cycloheximid (200µg/ml) zugegeben und damit die Transkription und Translation gestoppt. Pro Zeitpunkt wurde Zellsuspension korrespondierend zu 2 OD_{600} durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Danach erfolgten SDS-PAGE, Blot und Immunodetektion.

Membranextraktion

100 OD_{600} Zellen wurden durch Spheroblastieren und Homogenisieren aufgeschlossen. Unlöslicher Zellschrott wurde durch Zentrifugieren bei 500xg für 5 min abgetrennt. Die Suspension wurde in gleiche Teile aufgetrennt und entweder mit Lyse-Puffer, 2,5 M Harnstoff, 0,8 M Kaliumacetat, 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 11, 1 M Natriumchlorid, 1 % SDS w/v oder 1 % Triton X-100 v/v für 30 min inkubiert. Die Probe mit SDS wurde bei Raumtemperatur, alle anderen auf Eis inkubiert. Danach wurden alle Proben bei 4°C, 20 000xg für 30 min zentrifugiert und anschließend die Überstände in neue Gefäße überführt. Die Proteine aus dem Überstand wurden durch Zugabe von TCA (10 % Endkonzentration) für 10 min auf Eis ausgefällt und 10 min bei 13 000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das pelletierte Material in Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % SDS w/v; 0,1 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau w/v; 1,5 % Dithiothreitol w/v) gelöst. Anschließend erfolgten SDS-PAGE, Blot und Immunodetektion.

Deglykosylierung von Proteinen

Der Aufschluss der Hefezellen zur Deglykosylierung erfolgte analog der Membranextraktion. Die Suspension wurde in zwei Teile geteilt, jeweils mit 5 µl Inhibitor-Mix (Complete, Boehringer), 1 ml IP Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1,25 % Triton X-100 v/v; 6 mM EDTA; 190 mM NaCl) versetzt und für 15 min bei 20 000xg zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Gefäße

überführt, Antikörper zugegeben und 1 h über Kopf geschüttelt. Anschließend wurde Protein A Sepharose zugegeben und eine weitere Stunde geschüttelt. Es wurde 30 s bei 500xg zentrifugiert und die Sepharose 3 mal mit je 1 ml IP Puffer gewaschen. Danach wurde einmal mit 500 µl Waschpuffer (50 mM Kaliumphosphat pH 5,5; 0,02 % SDS w/v) gewaschen und zur Sepharose 25 µl Endo H Puffer (50 mM Kaliumphosphat pH 5,5; 0,02 % SDS w/v; 100 mM β-Mercaptoethanol) gegeben. Zu einer der beiden Proben wurden 4 mU Endo H zugegeben und beide Proben für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 30 µl Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % SDS w/v; 0,1 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau w/v; 1,5 % Dithiothreitol w/v) zugegeben und SDS-PAGE, Blot und Immunodetektion durchgeführt.

Protease-Verdau

Der Aufschluss der Hefezellen zum Protease-Verdau erfolgte analog der Membranextraktion. Die Suspension wurde in gleiche Teile aufgetrennt und entweder mit Lyse-Puffer, Trypsin (0,5 mg/ml), Trypsin (0,5 mg/ml) und Triton X-100 (1 %), Proteinase K (0,5 mg/ml) oder Proteinase K (0,5 mg/ml) und Triton X-100 (1 %) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Verdau durch TCA (10 % Endkonzentration) gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 13 000xg zentrifugiert und das Pellet in Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % SDS w/v; 0,1 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau w/v; 1,5 % Dithiothreitol w/v) gelöst. Anschließend erfolgten SDS-PAGE, Blot und Immunodetektion.

CPY Aktivitätstest

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

Transport- und Abbaukinetik

Zur Expression von radioaktiv markierten Proteinen wurden die Zellen bis zu einer OD_{600} von 0,5-1 in CM-Medium herangezogen und 5-10 OD_{600} Hefezellen 3 mal mit „labeling“ Medium (SC-Medium mit 0,1% Glucose, ohne Methionin, Cystein und Ammoniumsulfat) gewaschen und anschließend in 1 ml „labeling“ Medium resuspendiert. Danach wurden die Hefen 50 min geschüttelt, je nach Stamm bei 25, 30 oder 37°C. Auf die jeweilige Temperatur wird im Ergebnisteil hingewiesen. Durch Zugabe von 250 µCi [^{35}S]Methionin wurden die Zellen für 5 (CPY und PrA Reifung) oder 20 min (CPY*, CT* und CTG* Abbau) pulsmarkiert. Danach wurde der Einbau von [^{35}S]Methionin durch Zugabe von 1 ml „chase“ Medium (6 mg/ml Methionin; 2 mg/ml BSA in „label“ Medium, auf Versuchstemperatur vorgewärmt) gestoppt. Es wurde die erste Probe entnommen, die weiteren Proben wurden nach den in den Experimenten angegebenen Zeiten entnommen. Es wurden je 450 µl der Zellsuspension zu 50 µl TCA Lösung (110 % w/v) gegeben und entweder bei –80°C eingefroren oder auf Eis gelagert. Die Proben wurden nach dem „chase“ gemeinsam 8 min bei 14000xg zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml

kaltem Aceton gewaschen. Zu dem Pellet wurde 100 µl BB1 Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 6 M Harnstoff; 1 % SDS w/v, 1 mM EDTA) und Glasperlen zugegeben und das Pellet mit einem Zahnstocher aufgewirbelt. Danach wurde 1 min auf 95°C erhitzt und anschließend 1 min auf der Rüttelplattform geschüttelt. Dies wurde noch 4 mal wiederholt und anschließend 5 µl Inhibitor Mix (Complete, Boehringer) und 1 ml IP Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1,25 % Triton X-100 v/v; 6 mM EDTA; 190 mM NaCl) zugegeben. Es wurde 15 min bei 14000xg zentrifugiert und 1 ml des Überstandes in ein neues Gefäß überführt. Dann wurde 5 µl Antikörper zugegeben und 1 h im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 80 µl Protein A Sepharose Suspension (7 % w/v in IP Puffer ohne Triton X-100) zugegeben und eine weitere Stunde im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugieren für 30 s bei 500xg am Boden gesammelt und der Überstand abgenommen. Die Sepharose wurde 3 mal mit IP Puffer gewaschen und anschließend 60 µl Harnstoffpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % SDS w/v; 0,1 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau w/v; 1,5 % Dithiothreitol w/v) zugegeben und 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde SDS-PAGE durchgeführt und das Gel auf dem Geltrockner getrocknet. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiografie, zur Quantifizierung wurden ein Detektionsscreen (Amersham) und ein PhosphorImager (Molecular Probes) verwendet.

Präparation von Hefezellen zur Elektronenmikroskopie

Zur Fixierung der Hefezellen für die Elektronenmikroskopie wurden 25 OD_{600} logarithmisch wachsende Zellen geerntet, 1 h in 10 ml frisch hergestelltem Fixierungspuffer (4 % Formaldehyd w/v; 0,5% Glutaraldehyd v/v; 0,1 M Natriumcitrat pH 5) bei der Wachstumstemperatur des Stammes inkubiert und danach 2 mal mit Citratpuffer (0,1 M Natriumcitrat, pH 5) gewaschen (Kärgel et al., 1996; Zimmer et al., 1997). Die Zellen wurden 1 h in 1 % Natriumperiodat (w/v) inkubiert, um dem Gefrierschutz das Durchdringen der Zellwand zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen in der Gefrierschutzlösung (25 % Polyvinylpyrrolidin PVP K15/ MW 10000; 1,6 M Succrose) 2-3 Stunden inkubiert (Tokuyasu, 1989). Die Zellsuspension wurde auf einen Träger aufgebracht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –115°C mit einem Ultracryotom (Ultracut S mit FCS Einheit, LEICA) geschnitten. Die ultradünnen Schnitte wurden aufgetaut und auf mit Formvar/Kohlenstoff behandelte Kupfernetze aufgebracht. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper (Immunogoldkomplexe, 12 nm) wurde nach Griffiths (Griffiths, 1993) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit einer Markierungs- und Stabilisierungslösung (3 % Wolframatokieselsäure Hydrat w/v; 2,5 % Polyvinylalkohol Mr 10000, Sigma) behandelt.

Southern-Blot

Eine 2 ml Übernachtkultur in YPD wurde 3 min bei 500xg abzentrifugiert, die Hefezellen mit 500 µl Wasser gewaschen, noch einmal zentrifugiert und in 500 µl Wasser aufgenommen. Es wurden 200 µl Aufschlusspuffer (2 % Triton X-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl

pH 8; 1 mM EDTA), 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 50 µl Glasperlen hinzugefügt. Es wurde für 10 min bei 4°C gevortext und anschließend bei 20 000xg zentrifugiert, bis die wässrige Phase klar war (ca. 15-25 min). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt, 1 ml Ethanol zugegeben und 15 min bei –20°C inkubiert. Es wurde 10 min bei 20 000xg zentrifugiert und das getrocknete Pellet in 400 µl Wasser gelöst. Danach wurde RNase A (75 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl Ammoniumacetat (5 M) und 1 ml Ethanol durch 10 minütige Inkubation bei –20°C gefällt. Danach wurde 10 min bei 20 000xg zentrifugiert und das getrocknete Pellet in 20 µl Wasser gelöst. Die chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen über Nacht verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer auf Hybond-N Membran (Amersham) erfolgte mittels Vakuum (Ausubel, 1992). Anschließend wurde die Membran für 5 min UV-Licht ausgesetzt. Die Sondenpräparation und Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Amersham, DNA-Star Detektion Kit).

DNA-Färbung in lebenden Zellen

Um die DNA in der Zelle anzufärben, wurden Hefezellen mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 Trihydrochloridtrihydrat behandelt. 100 µl einer Hefekultur (0,5 OD_{600}) wurden 3 min bei 500xg zentrifugiert, die Zellen mit 100 µl HEPES Puffer (10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$ pH 7,4) gewaschen und anschließend in 100 µl HEPES Puffer aufgenommen. Es wurde 1 µl einer Hoechst 33342 Lösung in Wasser (1 mg/ml) zugegeben und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 mal mit 100 µl HEPES Puffer gewaschen und in 100 µl HEPES Puffer aufgenommen. Anschließend konnte die DNA im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

Ergebnisse

Charakterisierung der neuen ERAD Substrate CT* und CTG* im Vergleich mit CPY*

Die neuen Abbausubstrate CT* und CTG*

Es gibt zahlreiche gut charakterisierte Substrate, die über ERAD abgebaut werden. Insbesondere handelt es sich dabei um mutierte Proteine, deren Fehlen im Menschen Krankheiten auslösen wie CFTR, reguliert abgebaute Proteine wie HmgCoA-Reduktase oder mutierte Proteine, die als Modellsubstrate dienen wie CPY*. Weitere Beispiele finden sich im Übersichtsartikel von Kostova und Wolf, 2002.

Aus den Untersuchungen unterschiedlicher Abbausubstrate wird versucht ein Modell für ERAD und die Qualitätskontrolle im ER abzuleiten. Unterschiede in den am Abbau beteiligten Komponenten lassen in der Regel wenig Rückschlüsse auf den Mechanismus zu und sind oft nicht auf andere Substrate zu übertragen, da die Abbausubstrate zu große strukturelle Unterschiede aufweisen. Ein Beispiel sind die Chaperone der Hsp70 Familie aus dem Zytosol. Es ist bekannt, dass sie am Abbau von CFTR beteiligt sind (Jiang et al., 1998; Zhang et al., 2001), aber nicht am Abbau von deglykosyliertem α Faktor (Brodsky et al., 1999), CPY* (Deak, 2001) oder Sec61-2p (Zhang et al., 2001). Warum das so ist, kann man aus dem Vergleich dieser vier Substrate nicht sicher schließen. Aus den unterschiedlichen Eigenschaften der vier Substrate kann man vermuten, dass die Chaperone gebraucht werden, um zytosolische Domänen vor dem Abbau zu entfalten (Hill und Cooper, 2000). Es könnte aber auch sein, dass die Hsp70 Chaperone an ungefaltete zytosolische Bereiche binden und den Abbau des gesamten Proteins veranlassen (Meachum et al., 2001).

Um eine Klasse einfach vergleichbarer ERAD Substrate zu generieren, wurde an den C-Terminus von CPY* eine Transmembrandomäne (CPY*-Transmembrandomäne, CT*) oder eine Transmembrandomäne mit gefalteter Domäne im Zytosol angehängt (CPY*-Transmembrandomäne-grün fluoreszierendes Protein, CTG*). Die drei Substrate sind in Abb. 3 schematisch

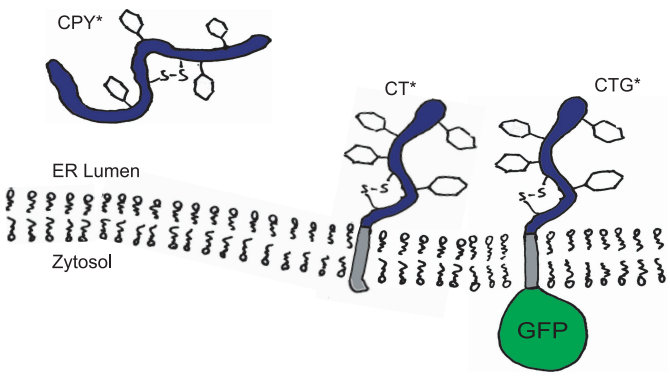


Abbildung 3: Topologie der ERAD Substrate CPY*, CT* und CTG*.
Schematische Darstellung der drei Modellsubstrate, die Topologie von CT* und CTG* wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt.

dargestellt. CPY* ist ein lösliches Protein, das sich im Lumen des ER befindet (Finger et al., 1993), CT* und CTG* sind Typ I Membranproteine mit dem N-Terminus im ER Lumen und dem C-Terminus im Zytosol.

Das für das Fusionsprotein CTG* kodierende Gen wurde von M. Lokhova hergestellt, eine Übersicht der Vorgehensweise befindet sich im Anhang. CT* wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Topologie der drei Substrate ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Die Lokalisierung und der Abbau von CPY* sind gut untersucht (Plemper und Wolf, 1999; Plemper et al., 1999a; Deak und Wolf, 2001), die Eigenschaften von CT* und CTG* wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Lokalisierung von CT* und CTG*

Bei der Konstruktion von CT* und CTG* wurde an CPY* die letzte Transmembrandomäne von Pdr5p angefügt, bzw. für CTG* zusätzlich noch GFP hinzugefügt. Um zu zeigen, dass CT* und CTG* die Membran durchspannen, wurden Membranextraktionsexperimente durchgeführt. Dies ist in Abbildung 4 exemplarisch für CTG* gezeigt; die gleichen Versuche wurden auch für CT* durchgeführt (nicht gezeigt). Die Hefezellen wurden durch Spheroblastieren sanft lysiert, ohne dabei die Organellen zu zerstören und verschiedenen Chemikalien ausgesetzt. Harnstoff, Kaliumacetat und Natriumcarbonat sind in der Lage, periphere Membranproteine von der Membran abzulösen und in den Überstand zu überführen. Transmembranproteine verbleiben in der Pellet-Fraktion. Transmembranproteine werden nur beim Zusatz von Detergenzien wie SDS oder Triton X-100 in die lösliche Fraktion gebracht, da die Organellmembranen aufgelöst werden. CTG*

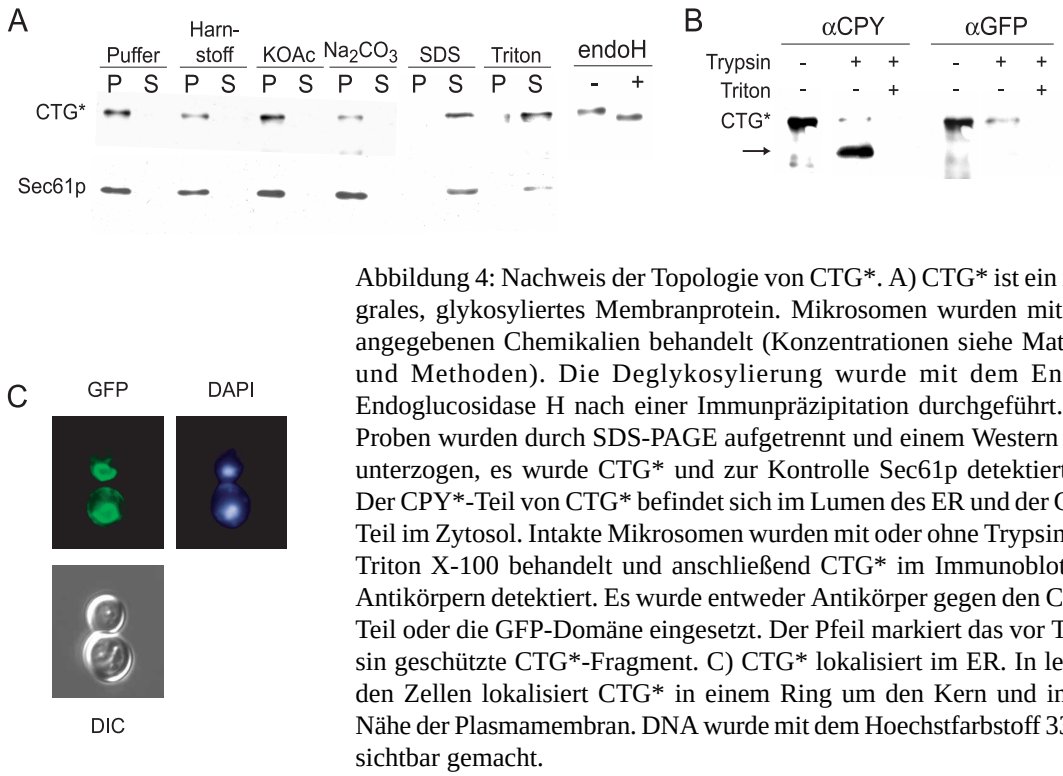


Abbildung 4: Nachweis der Topologie von CTG*. A) CTG* ist ein integrales, glykosyliertes Membranprotein. Mikrosomen wurden mit den angegebenen Chemikalien behandelt (Konzentrationen siehe Material und Methoden). Die Deglykosylierung wurde mit dem Enzym Endoglucosidase H nach einer Immunpräzipitation durchgeführt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einem Western Blot unterzogen, es wurde CTG* und zur Kontrolle Sec61p detektiert. B) Der CPY*-Teil von CTG* befindet sich im Lumen des ER und der GFP-Teil im Zytosol. Intakte Mikrosomen wurden mit oder ohne Trypsin und Triton X-100 behandelt und anschließend CTG* im Immunoblot mit Antikörpern detektiert. Es wurde entweder Antikörper gegen den CPY* Teil oder die GFP-Domäne eingesetzt. Der Pfeil markiert das vor Trypsin geschützte CTG*-Fragment. C) CTG* lokalisiert im ER. In lebenden Zellen lokalisiert CTG* in einem Ring um den Kern und in der Nähe der Plasmamembran. DNA wurde mit dem Hoechstfarbstoff 33342 sichtbar gemacht.

und CT* werden nur durch Detergenzien in Lösung gebracht, es handelt sich also um Transmembranproteine (Abbildung 4 A und nicht gezeigt). CPY* wird an 4 Konsensussequenzen glykosyliert (Knop et al., 1996b), CT* und CTG* werden ebenfalls glykosyliert. Durch Inkubation mit dem Zuckerketten abspaltenden Enzym EndoH wird das Molekulargewicht von CTG* und CT* erniedrigt (Abbildung 4 A und nicht gezeigt).

Wenn man lysierte Spheroblasten mit einer Protease wie Trypsin inkubiert, werden alle zytosolischen Proteine und die zytosolischen Domänen von Transmembranproteinen verdaut während Proteine oder Proteinteile, die sich in Zellorganellen befinden, geschützt bleiben. Transmembranproteine mit zytosolischen Domänen werden somit nur teilweise verdaut und man kann dies als Molekulargewichtsänderung im Western Blot sichtbar machen. Wie aus Abbildung 4 B ersichtlich, wird bei CTG* selektiv die GFP-Domäne zerstört, während der Membran- und CPY*-Teil des Proteins vor der Protease geschützt bleiben.

Zur Lokalisierung von CTG* wurden Hefezellen mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 behandelt, dieser bindet an DNA und macht so den Zellkern im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar. Das ER bildet die Hülle um den Zellkern und zusätzlich ein tubuläres Netzwerk in der Zellperipherie. Die Fluoreszenz der GFP-Domäne in CTG* zeigt eine für ER-Lokalisation typische Verteilung (Abbildung 4 C).

Reifung und Aktivität von CT und CTG

CPY*, CT* und CTG* enthalten alle das gleiche Abbausignal im Lumen des ER: die Punktmutation in CPY*. Um zu zeigen, dass die Fusionsproteine CT* und CTG* nicht aufgrund der Membranverankerung von der Qualitätskontrolle im ER zurückgehalten und abgebaut werden, wurde der CPY* Teil der Fusionsproteine durch CPY ersetzt und so die neuen Fusionsproteine CT (CPY-Transmembrandomäne) und CTG (CPY-Transmembrandomäne-GFP) erzeugt. Der Western Blot zeigt, dass CT und CTG genau wie CPY zu einem Protein von ca. 61 kDa prozessiert werden, während CT*, CTG* und CPY* eine Größe aufweisen die den ungereiften, ER lokalisierten Proteinen entspricht (Abbildung 5 A).

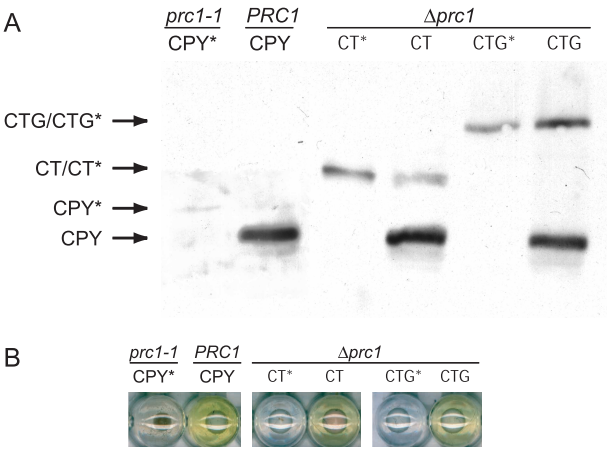


Abbildung 5: CT und CTG werden gereift und zeigen CPY Aktivität. A) Vergleich der Molekulargewichte von CPY*, CPY, CT*, CT, CTG* und CTG im Immunoblot. Die Positionen von CPY*, CPY, CT*, CT, CTG* und CTG sind durch Pfeile markiert. B) CPY spezifische Aktivitätsmessung *in vitro*. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C in der Substratlösung inkubiert. Die Freisetzung des gelben Farbstoffes zeigt spezifische CPY Aktivität an.

Der Nachweis reifer CPY ist *in vitro* durch spezifische Aktivität gegenüber N-Benzoyl-L-Tyrosin-p-Nitroanilid (BTPNA) möglich. Dieses Substratanalogon wird nur von aktiver CPY zu dem gelben Farbstoff p-Nitroanilid umgesetzt (Guthrie und Fink, 1991). CT und CTG zeigen beide dieselbe Aktivität gegenüber BTPNA wie CPY (Abbildung 5 B). Diese beiden Versuche zeigen, dass CT* und CTG* nur durch die Mutation im CPY*-Teil der Fusionsproteine als missgefaltet erkannt werden. Die Transmembrandomäne wird von der ER Qualitätskontrolle nicht als Abbausignal erkannt.

Abbau von CT* und CTG*

CT* und CTG* sind instabile Proteine. Sie werden durch die Punktmutation im CPY*-Teil des Fusionsproteins destabilisiert. Um zu zeigen, dass CT* und CTG* Substrate für ERAD sind, wurde ihr Abbau in Hefestämmen verfolgt, die Defekte in ERAD aufweisen. Getestet wurde der Abbau bei defektem Proteasom, in Stämmen die Defekte in den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) Ubc1p und Ubc7p und der Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) Der3/Hrd1p aufweisen. Ferner wurde der Abbau in einem Stamm mit Defekten in der Proteindislokation vom ER ins Zytosol untersucht. Ausgewählt wurden die Stämme, weil sie Defekte in Proteinen aufweisen, die am Abbau von CPY* beteiligt sind.

CT und CTG* benötigen zum Abbau funktionelles Proteasom*

In dem proteasomalen Doppelmutant *pre1-1 pre4-1* ist die proteolytische Aktivität des Proteasoms stark eingeschränkt. Substrate, die vom Proteasom abgebaut werden, besitzen in diesen Zellen eine deutlich längere Halbwertszeit. Auch die Degradation von CT* und CTG* ist in diesen Stämmen langsamer als in Wildtyp Zellen, dies deutet auf einen Abbau im Proteasom hin (Abbildung 6). Eine vollständige Blockade des Abbaus kann in diesen Mutantenzellen nicht erwartet werden, da die Mutantenallele nur zu einer Einschränkung der proteolytischen Aktivi-

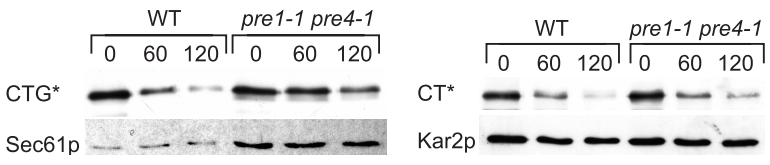


Abbildung 6: CTG* und CT* werden vom Proteasom abgebaut. Wildtyp Zellen und proteasomale Mutanten (*pre1-1 pre4-1*) Zellen wurden bei 30°C bis zur logarithmischen Phase angezogen, mit Cycloheximid versetzt (Zeit=0 min) und die Abbaukinetik über 120 Minuten verfolgt. Die Detektion im Immunoblot erfolgt mit αCPY Antikörpern, die Ladekontrollen wurden mit αSec61p bzw. αKar2p detektiert.

tät des Proteasoms führen. Da das Proteasom essenziell für das Überleben einer Eukaryontenzelle ist, ist es nicht möglich Mutantenzellen zu erhalten die nicht zumindest eine gewisse proteasomale Aktivität aufweisen.

Die Ubiquitin konjugierenden Enzyme Ubc1p und Ubc7p werden für den Abbau von CT und CTG* benötigt*

Substrate die über das Proteasom abgebaut werden, erhalten als Abbaumarkierung Polyubiquitinketten (Hershko und Ciechanover, 1998). Die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf das Substrat erfolgt im Falle von CPY* vor allem über die E2 Proteine Ubc1p und Ubc7p. Fehlen diese beiden Enzyme, ist die Degradation stark gestört (Friedländer et al., 2000; Hiller et al., 1996). Auch der Abbau von CTG* und CT* ist in Doppelmutanten, die weder Ubc1p noch Ubc7p produzieren, stark verzögert (Abbildung 7).

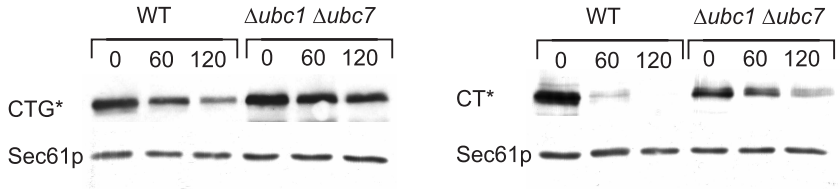


Abbildung 7: CTG* und CT* benötigen die Ubiquitin konjugierenden Enzyme Ubc1p und Ubc7p zum Abbau. Wildtyp und *Δubc1Δubc7* Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase angezogen, die Proteinsynthese durch Cycloheximid Zugabe gestoppt (Zeit=0 min) und der Abbau über 120 Minuten verfolgt. Die Detektion erfolgte durch Immunoblot mit αCPY und αSec61p Antikörpern.

Der3/Hrd1p ist am Abbau von CT und CTG* beteiligt*

Um Ubiquitin auf das Substrat zu übertragen, wird als Vermittler zwischen E2 und Substrat ein weiteres Protein oder ein weiterer Proteinkomplex, die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3), gebraucht. Für den Abbau von CPY* ist bisher die Beteiligung eines E3s nachgewiesen, der Ubiquitin-Protein-Ligase Der3/Hrd1p (Bays et al., 2001a; Deak und Wolf, 2001). Auch CTG* und CT* werden in Der3/Hrd1p Mutanten verlangsamt abgebaut (Abbildung 8). In Wildtyp Zellen beträgt die Halbwertszeit von CT* ca. 20 min und von CTG* ca. 40 min bei 30°C. In *Δder3/hrd1* Zellen ist der Abbau jeweils deutlich verlangsamt.

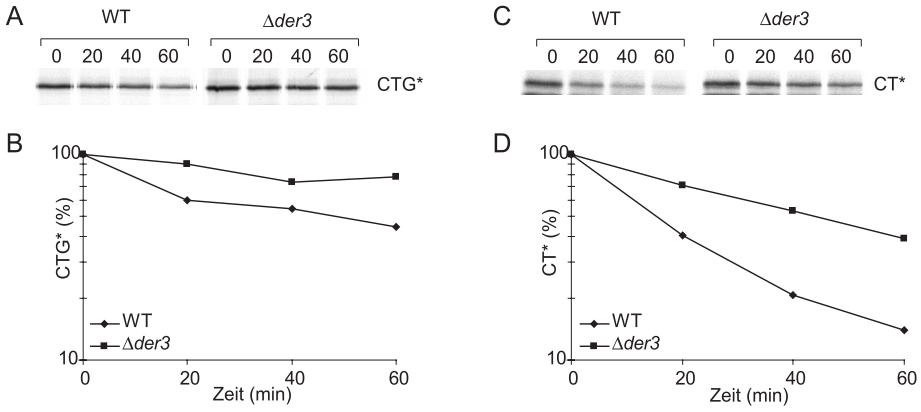


Abbildung 8: Das Ubiquitin übertragende Enzym Der3/Hrd1p wird zum Abbau von CTG* und CT* benötigt. In logarithmisch wachsenden Wildtyp und *Δder3/hrd1* Zellen wurde die Abbaukinetik von CTG* und CT* mittels „pulse-chase“ Analyse verfolgt. Die Zellen wurden bei 30°C angezogen, für 20 min mit ^{35}S-Methionin markiert und nach Zugabe von nicht-radioaktivem Methionin wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (in Minuten) Proben entnommen. Die Immunpräzipitation erfolgte mit αCPY Antikörpern. A) Autoradiogramm des CTG* Abbaus in WT und *Δder3/hrd1* Zellen. B) Kinetik des CTG* Abbaus. C) Abbau von CT* in WT und *Δder3/hrd1* Zellen. D) Kinetik des CT* Abbaus.

Beteiligung des Translokons am Abbau von CT und CTG**

Proteine werden durch das Translokon ins ER und, falls sie als falsch gefaltet erkannt werden, auch wieder durch dieses hinaustransportiert (Johnson und van Waes, 1999). Für CPY* wurde gezeigt, dass der Abbau in einer Mutante mit einem temperatursensitiven Allel von Sec61p (*sec61-2*) bei 25°C verlangsamt abläuft. Der Proteinimport war unter diesen Bedingungen ungestört, da keine niedermolekulare Pre-pro-CPY*-Form mit einem Molekulargewicht von ca. 61 kDa auftrat (Plemper et al., 1997). Derselbe Versuch wurde für CT* und CTG* wiederholt. Beide Substrate wurden zusätzlich zu CPY* exprimiert und der Abbau in einem „pulse-chase“ Experiment verfolgt. Hierbei traten jedoch Importprobleme für CPY* und CT* auf, während für CTG* keine Importdefekte sichtbar waren (Abbildung 9). Durch diese Importprobleme ist ein Vergleich des Abbaus mit Wildtypzellen nicht mehr möglich, da der verzögerte Import in *sec61-2* Zellen die Abbaukinetik verändert.

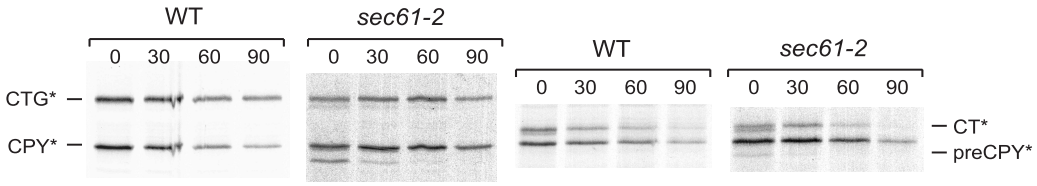


Abbildung 9: Autoradiogramm des Abbaus von CPY*, CTG* und CT* in WT und *sec61-2* Zellen. Die Zellen wurde bei 25°C angezogen und die Abbaukinetik von CPY*, CTG* und CT* mittels „pulse-chase“ Analyse verfolgt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (in Minuten) entnommen. Die Zellen wurden wie in Abbildung 8 beschrieben behandelt.

Aus den Untersuchungen zum Abbau von CT* und CTG* kann geschlossen werden, dass beide Substrate, wie CPY*, über ERAD abgebaut werden. Damit sind diese drei Proteine vorzügliche Modellsubstrate, um die Unterschiede im Abbau von löslichen und membrangebundenen (mit und ohne zytosolische Domäne) ERAD-Substraten zu untersuchen. Alle drei werden aufgrund derselben Mutation im lumenalen Teil als falsch gefaltet erkannt und dem Abbau zugeführt.

Einfluss von Chaperonen der Hsp70 Familie und assoziierter Proteine auf den Abbau von CT* und CTG*

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Hsp70 Chaperone der zytosolischen Ssa-Familie nicht für den Abbau von CPY* benötigt werden (Deak, 2001). Dagegen ist Kar2p, ein Hsp70 Chaperon des ER Lumens, am Abbau von CPY* beteiligt (Plemper et al., 1997), während es beim Abbau von falsch gefalteten Membranproteinen, wie z.B. Pdr5*, keine Rolle spielt (Plemper et al., 1998). Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die Familie der Ssa-Proteine beim Abbau von membrangebundenen und Transmembranproteinen mit zytosolischer Domäne beteiligt sind. Untersucht wurde dies am Beispiel von CT* und CTG*. Für Kar2p sollte geklärt werden, ob es generell für den Abbau von Membranproteinen keine Rolle spielt oder ob es spezifisch für die Erkennung der falschen Faltung von CPY* benötigt wird. Im letzteren Fall müsste es am Abbau von CT* und CTG* beteiligt sein.

Das lumenale Chaperon Kar2p

Wie aus dem „pulse chase“ Versuch in Abbildung 10 ersichtlich, ist nur bei CPY* ein Unterschied in der Abbaukinetik zwischen WT und *kar2-159* Zellen zu beobachten. Die CT*- und CTG*-Mengen nehmen im WT wie im Mutantenstamm jeweils gleich schnell ab. Daraus kann geschlossen werden, dass Kar2p bei der Erkennung des Degradationssignals keine Rolle spielt. Seine Funktion ist offenbar auf den Abbau löslicher lumenaler, falsch gefalteter Proteine beschränkt.

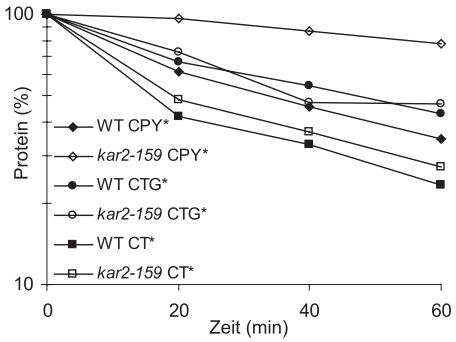


Abbildung 10: Kar2p ist nicht am Abbau von CTG* und CT* beteiligt. Die Kinetik des CPY*, CTG* und CT* Abbaus in WT und *kar2-159* Zellen wurde mittels „pulse-chase“ Analyse verfolgt. Die Zellen wurden bei 25°C angezogen, markiert und zum Zeitpunkt t=0 auf die restriktive Temperatur von 32°C gebracht.

Die Ssa-Familie im Zytosol

Die Chaperone der Ssa-Familie sind an vielen Aufgaben in der Zelle beteiligt. Sie spielen insbesondere eine Rolle beim Protein-Import in Mitochondrien und ins ER (Becker et al., 1996), bei der Proteinfaltung (Johnson und Craig, 2001), bei der Translation (Horton et al., 2001) und bei der Proteindegradation (Zhang et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit „pulse-chase“ Untersuchungen getestet, ob sie auch für den Abbau von CT* oder CTG* benötigt werden. In Hefe gibt es vier Gene, die für die Hsp70 Chaperone der Ssa-Familie codieren, *SSA1*, *SSA2*, *SSA3* und *SSA4*. Die Genprodukte habe alle

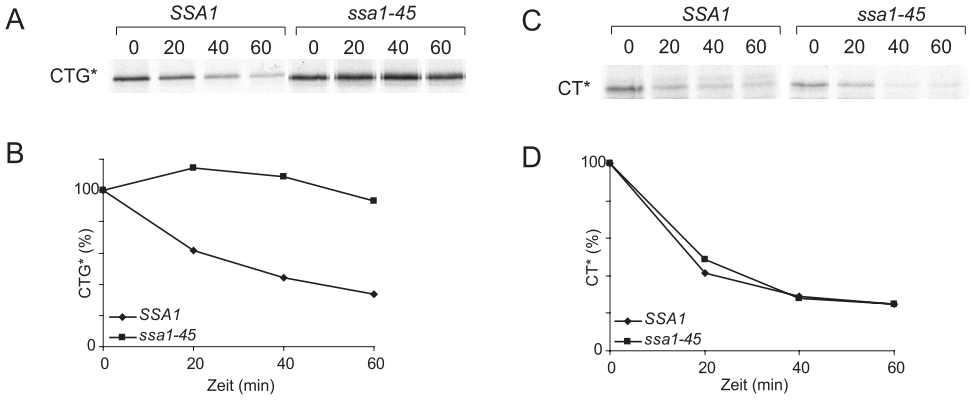


Abbildung 11: Die Hsp70 Chaperone der Ssa-Familie werden zum Abbau von CTG* gebraucht. Der Abbau von CTG* und CT* wurde in *SSA1* und *ssa1-45* Zellen in einem „pulse-chase“ Experiment untersucht. Die Zellen wurden bei 25°C angezogen und bei Zugabe des radioaktiven Methionins auf 37°C gebracht. Die Probennahme, Zellaufschluss, Immunpräzipitation und SDS-PAGE erfolgte wie im Material und Methodenteil beschrieben. A) und B) Abbaukinetik von CTG* in *SSA1* und *ssa1-45* Zellen. C) und D) Abbau von CT* in *SSA1* und *ssa1-45* Zellen.

die gleiche Funktion, sie können sich gegenseitig ersetzen. Zur Messung des Abbaus von CT* und CTG* wurden Zellen verwendet, bei denen die Gene *SSA2*, *SSA3* und *SSA4* zerstört sind. Die Zellen exprimieren entweder Ssa1p oder das bei restriktiver Temperatur infunktionelle Protein Ssa1-45p. Wie Abbildung 11 zeigt, ist bei restriktiver Temperatur der Abbau von CTG*, nicht aber von CT*, in *ssa1-45* Mutantenzellen praktisch verhindert. Da CT* in *ssa1-45* Zellen abgebaut wird, sind die Chaperone vermutlich in die Entfaltung der zytoplasmatischen GFP-Domäne involviert.

Aufgrund der Signalsequenz von CPY, welche zum post-translationalen Import ins ER führt (Walter und Johnson, 1994), wird wahrscheinlich auch CTG* post-translational ins ER transportiert. Es ist bekannt, dass bestimmte post-translational importierte Proteine zum Import ins ER funktionelle Chaperone der Ssa-Famlie benötigen. CPY gehört jedoch nicht in diese Gruppe (Becker et al., 1996). Um auszuschließen, dass die beobachteten Defekte im Abbau von CTG* in *ssa1-45* Zellen auf Probleme beim Import von CTG* ins ER zurückzuführen sind, wurde die CPY Signalsequenz durch die von *SUC2* Signalsequenz ersetzt. Diese führt zu kotranslationalem

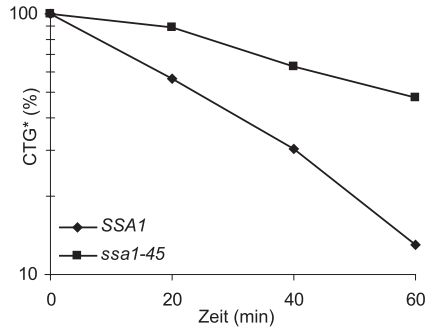


Abbildung 12: Auch bei kotranslationalem Import von CTG* ins ER ist der Abbau abhängig von Chaperonen der Ssa-Familie. CTG* mit der Invertase Signalsequenz wurde in *SSA1* und *ssa1-45* Zellen exprimiert und der Abbau in einem „pulse-chase“ Experiment untersucht. Die Zellen wurden wie in Abbildung 11 beschrieben behandelt.

Proteinimport ins ER. Der Abbau dieses so modifizierten CTG* wurde im „pulse-chase“ Experiment verfolgt. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, erfolgte der Abbau in *ssa1-45* Zellen, wie im Falle des CTG* mit CPY* Signalsequenz, wesentlich langsamer als in *SSA1* Zellen.

Da der Defekt im Abbau von CTG* in *ssa1-45* Zellen unabhängig von der Importsequenz ist und der CT* Abbau unabhängig von den Chaperonen der Ssa-Familie ist können Proteinimportprobleme ins ER als Ursache für den langsamen CTG* Abbau in *ssa1-45* Zellen ausgeschlossen werden. Man kann davon ausgehen, dass die Chaperone direkt in den Abbau von CTG* involviert sind und vermutlich bei der Entfaltung der GFP-Domäne benötigt werden.

*Einfluss einzelner Mitglieder der DnaJ-Familie auf den Abbau von CTG**

Die Proteine der DnaJ-Familie binden an die Chaperone der Hsp70 Familie um funktionelle Komplexe zu bilden (Kelley, 1999). Die verschiedenen DnaJ-Proteine modulieren die Substratspezifität des Gesamtkomplexes (Rudiger et al., 2001). In *S. cerevisiae* gibt es über 20 Proteine, in denen das DnaJ-Motiv vorkommt. Von den meisten dieser Proteine ist noch keine zelluläre Funktion bekannt.

Um die DnaJ-Proteine zu identifizieren, die zusammen mit den Proteinen der Ssa-Familie am Abbau von CTG* beteiligt sind, wurde der Abbau des Substrates in Mutantenstämmen verfolgt, in denen einzelne Mitglieder der DnaJ-Familie fehlten. Ausgewählt wurden DnaJ-Proteine mit ungeklärter oder zytosolischer Lokalisation, ausgeschlossen wurden ER lumenal oder mitochondriell lokalisierte Spezies dieser Proteinfamilie. Als Vortest wurde der Abbau von CTG* in „cycloheximid-chase“ Experimenten in *Δyjl162*, *Δhlj1*, *Δyfr041*, *Δypr061*, *Δylr090*, *Δygr285*, *Δyjr097*, *Δyer048*, *Δynl227*, *Δynl077* und *Δyir004* Zellen untersucht (nicht gezeigt). Diese Stämme wurden der EUROSCARF Stammkollektion (Universität Frankfurt, Institut für Mikrobiologie) entnommen. In dieser Hefestammsammlung ist pro Stamm jeweils ein nicht essenzielles Gen durch das KAN^R Gen ersetzt.

Stämme, die im „cycloheximide-chase“ einen defekten CTG* Abbau anzeigten, wurden „pulse-chase“ Experimenten unterzogen (*Δhlj1*, *Δypr061*, *Δyer048 und Δylr090*); ferner wurde ein weiterer Stamm für den „pulse-chase“ ausgewählt bei dem das DnaJ-Protein durch die Antwort auf ungefaltete Proteine im ER stark exprimiert wird (*Δyfr041*). Von diesen fünf Mutantenstämmen war in *Δhlj1* und *Δypr061* Zellen eine Stabilisierung von CTG* zu beobachten (nicht gezeigt). Zur weitern Charakterisierung wurden die Gene *HLJ1* und *YPR061* im W303-1C Stammhintergrund zerstört. Zusätzlich wurde der Abbau von CTG* in *Δygl128* und temperatursensitiven *ydj1-151* Zellen im W303-1C Stammhintergrund untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 A und C dargestellt. Man erkennt, dass Ydj1p nicht an der Degradation von CTG* beteiligt ist, während *Δygl128*, *Δhlj1* und *Δypr061* Zellen einen Defekt im Abbau aufweisen.

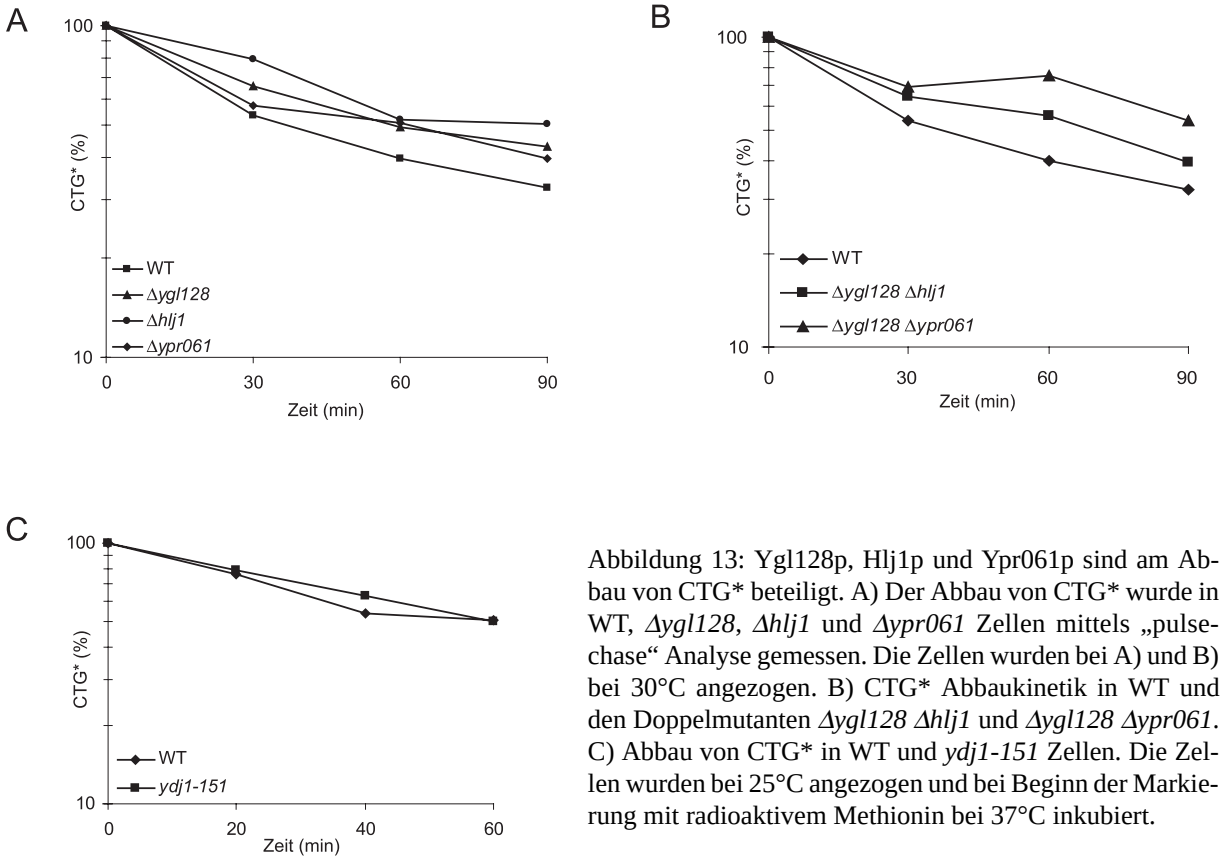


Abbildung 13: Ygl128p, Hlj1p und Ypr061p sind am Abbau von CTG* beteiligt. A) Der Abbau von CTG* wurde in WT, *Δygl128*, *Δhlj1* und *Δypr061* Zellen mittels „pulse-chase“ Analyse gemessen. Die Zellen wurden bei A) und B) bei 30°C angezogen. B) CTG* Abbaukinetik in WT und den Doppelmutanten *Δygl128 Δhlj1* und *Δygl128 Δypr061*. C) Abbau von CTG* in WT und *ydj1-151* Zellen. Die Zellen wurden bei 25°C angezogen und bei Beginn der Markierung mit radioaktivem Methionin bei 37°C inkubiert.

Der Abbau ist in diesen drei Stämmen nur leicht gestört, dies könnte auf eine redundante Funktion der Proteine hinweisen. Um dies zu untersuchen, wurden, durch Kreuzungen zwischen den Stämmen, Doppelmutanten hergestellt und auf den Abbau von CTG* hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Abbau in den Doppelmutanten, ähnlich wie in den Einzelmutanten, nur leicht defekt ist (Abbildung 13 B). Dies legt den Schluss nahe, dass die Funktion dieser drei Proteine überlappt. Es war leider nicht möglich, einen Hefestamm zu erhalten, in dem alle drei Proteine gleichzeitig fehlen.

Beteiligung des Cdc48p-Npl4p-Ufd1p Komplexes am Abbau von ungefalteten Proteinen aus dem ER

Cdc48p gehört zur Familie der AAA-ATPasen, die eine Vielzahl von zellulären Aufgaben erfüllen. Allgemein gehören sie zu den Chaperonen und sind in die Biogenese, Funktion und Dekonjugation von Proteinkomplexen involviert (Neuwald et al., 1999). Cdc48p kann verschiedene Komplexpartner binden. Im Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System spielt der zytosolisch lokalisierte Komplex mit Ufd1p und Npl4p eine Rolle (Hitchcock et al., 2001; Meyer et al., 2000; Rape et al., 2001). Aus Vorarbeiten von J. Bordallo war bekannt, dass Cdc48p zum Abbau von CPY* nötig ist (J. Bordallo, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse sollten durch „pulse-chase“ Experimente bestätigt werden, zusätzlich sollten die Komplexpartner Ufd1p und Npl4p auf Beteiligung am Abbau von CPY* hin untersucht werden.

Der Abbau von CPY wird in Mutanten des Cdc48p-Npl4p-Ufd1p Komplexes verlangsamt*

Zur Bestätigung des Abbaudefektes von CPY* in Cdc48p Mutanten wurden „pulse-chase“ Experimente mit den von J. Bordallo hergestellten Stämmen durchgeführt. *CDC48* ist in diesen Stämmen chromosomal zerstört und das Protein wird jeweils von einem auf Plasmid kodierten Allel unter der Kontrolle des *GAL1* Promotors exprimiert: Wildtypgen *CDC48* oder die Mutantenallele *cdc48E*, *cdc48F* oder *cdc48G* . Die Stämme wachsen auf Glucose, hier ist der *GAL1* Promotor weit gehend abgeschaltet und die Expression von Cdc48p und den Mutantenproteinen ist nur sehr schwach. Im „pulse-chase“ Experiment zeigt sich, dass die Stämme einen Defekt im Abbau von CPY* haben, der in den Mutantenstämmen stärker ist als im *CDC48* Stamm. Dieser zeigt aber eine längere Halbwertszeit von CPY* als der isogene Wildtyp W303-1C, der Cdc48p vom *CDC48* Promotor exprimiert (Abbildung 14 A). Wenn man den Abbau von CPY* in einem Stamm untersucht, der das Mutantenprotein Cdc48Ep chromosomal vom natürlichen Promotor exprimiert (Hefestamm YCT549), ist der Abbau ebenfalls gegenüber dem Wildtyp verlangsamt (Daten nicht gezeigt). Nach Überexpression von Cdc48p wird CPY* wesentlich langsamer abgebaut (Abbildung 14 B). Da der CPY* Abbau von der Cdc48p Menge in der Zelle abhängt, wurde die vorhandene Cdc48p Menge in logarithmisch wachsenden Hefezellen zwischen dem Wildtypstamm W303-1C, der Expression von Cdc48p vom *GAL1* Promotor bei Wachstum auf

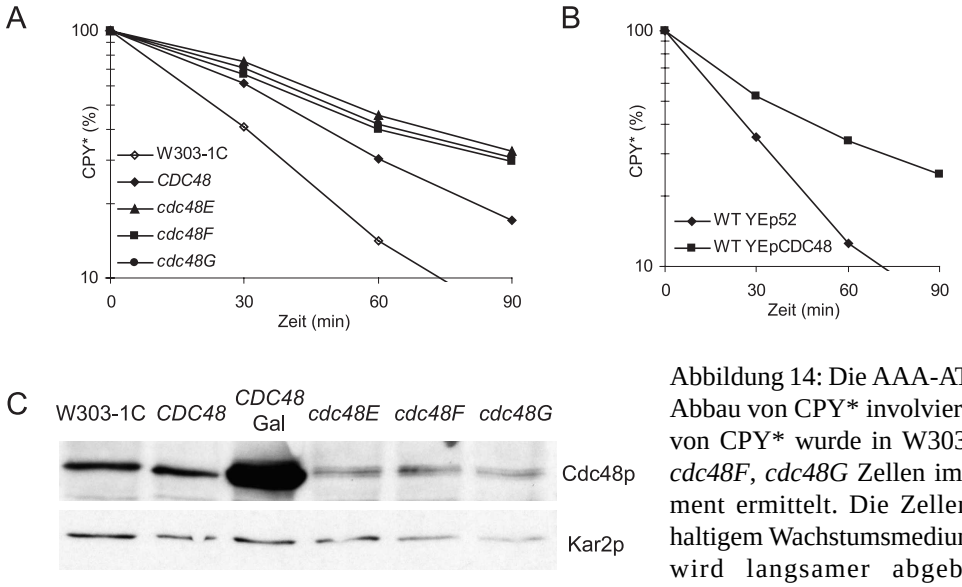


Abbildung 14: Die AAA-ATPase Cdc48p ist in den Abbau von CPY* involviert. A) Die Abbaukinetik von CPY* wurde in W303-1C, *CDC48*, *cdc48E*, *cdc48F*, *cdc48G* Zellen im „pulse-chase“ Experiment ermittelt. Die Zellen wurden in Glucose-haltigem Wachstumsmedium angezogen. B) CPY* wird langsamer abgebaut, wenn Cdc48p überexprimiert wird. WT Zellen mit P_{GAL1}*::CDC48* (YEpCDC48) bzw. Kontrollplasmid (YEp52) wurden in Glucose-haltigem Wachstumsmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, gewaschen, für drei Stunden in CM Medium mit 2% Galaktose inkubiert und anschließend einem „pulse-chase“ Experiment unterzogen. Im „labeling-„ und „chase-“ Medium wurde Glucose jeweils durch Galaktose ersetzt. C) „steady-state level“ von Cdc48p in Wildtyp (W303-1C, Glucose-haltiges Wachstumsmedium), *CDC48* (Glucose), *CDC48* (Galaktose), *cdc48E* (Glucose), *cdc48F* (Glucose) und *cdc48G* (Glucose) Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden mit der angegebenen Kohlenstoffquelle angezogen und Cdc48p bzw. Kar2p im Western Blot detektiert.

Glucose und Galaktose verglichen. Des Weiteren wurde der „steady-state level“ der Mutantenproteine bei Wachstum auf Glukose untersucht. Überaschenderweise ist die Cdc48p Menge bei Expression vom *CDC48* Promotor gleich hoch wie bei der Expression vom *GAL1* Promotor bei Wachstum auf Glukose (Abbildung 14 C). Erwarten würde man eine höhere Cdc48p Menge im W303-1C Stamm. Durch die gleiche Cdc48p Menge in diesen beiden Stämmen ist der langsamere Abbau von CPY* in *CDC48* Zellen beim Wachstum auf Glucose nicht erklärbar. Die Expression der Mutantenproteine Cdc48Ep, Cdc48Fp und Cdc48Gp ist erwartungsgemäß sehr gering (Abbildung 14 C). Damit korrelieren auch die Defekte im CPY* Abbau in diesen Zellen (Abbildung 14 A). Bei Induktion des *GAL1* Promotors durch Wachstum auf Galaktose wird Cdc48p stark überexprimiert (Abbildung 14C). Dies resultiert in einer Störung der Cdc48p Funktion und einem verlangsamten Abbau von CPY*. Zusammenfassend kann man feststellen, dass Cdc48p zum Abbau von CPY* benötigt wird und dass die Menge an Cdc48p eine kritische Rolle spielt.

Als Nächstes wurde untersucht, ob der Komplexpartner von Cdc48p, Ufd1p (Meyer et al., 2000; Rape et al., 2001), für den Abbau von CPY* benötigt wird. Abbildung 15 A zeigt, dass CPY* in einem Stamm mit mutiertem Ufd1p eine wesentlich längere Halbwertszeit hat als in einem Wildtyp-Stamm. Das gleichzeitig untersuchte Ufd3p ist, wie Ufd1p, ein Mitglied des so genannten UFD („ubiquitin-fusion-degradation“) Abbauweges (Johnson et al., 1995). Von Ufd3p ist bekannt, dass es den freien Ubiquitin Spiegel beeinflusst. Erwartungsgemäß ist der Abbau

von CPY* in *ufd3-1* Zellen gestört (Abbildung 15 A). Die anderen Mitglieder des UFD Abbauweges (Johnson et al., 1995) haben keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von CPY* (Daten nicht gezeigt).

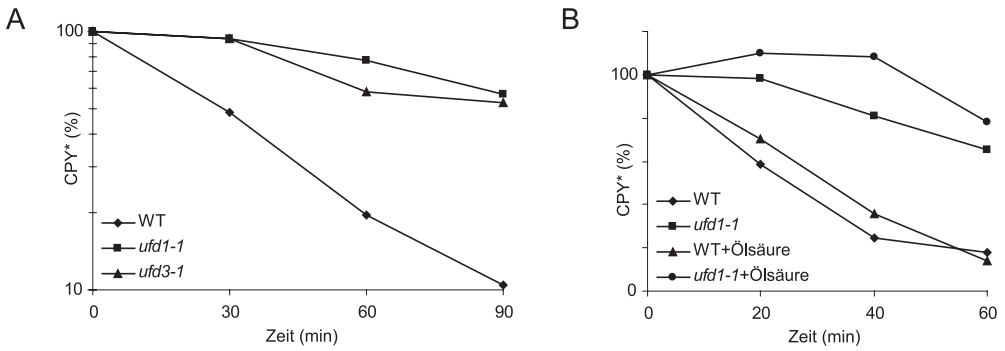


Abbildung 15: Der Abbau von CPY* hängt von funktionellem Ufd1p und Ufd3p ab. A) In WT, *ufd1-1* und *ufd3-1* Zellen wurde der Abbau von CPY* mittels „pulse-chase“ Experiment gemessen. B) Der CPY* Abbau in *ufd1-1* Zellen kann nicht durch Zugabe von Ölsäure beschleunigt werden. WT und *ufd1-1* Zellen wurden mit und ohne Ölsäure (0,2%) angezogen und die Abbaukinetik von CPY* im „pulse-chase“ Experiment bestimmt. Die Medien enthielten zusätzlich Nonidet P-40 (0,2%).

Da Ufd1p essenziell für die Kontrolle der Ölsäureherstellung in Hefe ist, weil es ist an der Regulation der Ole1p Synthese durch gezielte proteolytische Aktivierung der Transkriptionsfaktoren für *OLE1* notwendig ist (Hitchcock et al., 2001; Hoppe et al., 2000; Rape et al., 2001), wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte bei der CPY* Degradation auf fehlende Ölsäure und damit Änderungen in der Fluidität der ER Membran zurückzuführen sind, wurde Ölsäure den Wachstums- und „pulse-chase“-Medien zugesetzt und der Abbau von CPY* in *ufd1-1* Zellen beobachtet. Wie Abbildung 15 B zeigt, hat zusätzliche Ölsäure keinen Einfluss auf den gestörten Abbau von CPY* in *ufd1-1* Mutantenzellen.

Auch Npl4p, der dritte Partner im Cdc48p-Ufd1p-Npl4p Komplex, wurde auf eine Beteiligung beim CPY* Abbau hin getestet. In *npl4-1* Mutantenzellen wurde CPY*-HA exprimiert und der Abbau in einem „pulse-chase“ Experiment verfolgt. Der Abbau geschieht in diesen Zellen wesentlich langsamer als in Wildtypzellen (Abbildung 16).

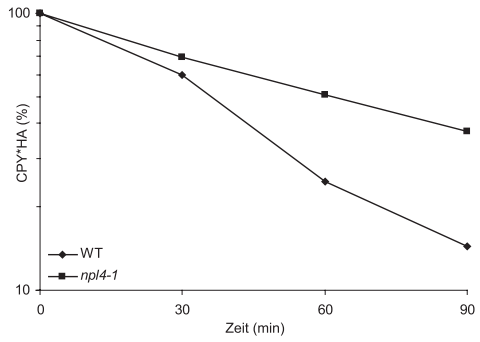


Abbildung 16: Npl4p ist in den Abbau von CPY* involviert. Der Abbau von CPY*-HA wurde in WT und *npl4-1* Zellen durch „pulse-chase“ Analyse bestimmt. Die Zellen wurden bei 25 °C angezogen und 60 min vor der Proteinmarkierung auf 37 °C gebracht.

Der Abbau von CT und CTG* hängt von Cdc48p ab*

Um zu untersuchen, ob der Cdc48 Komplex eine generelle Rolle in ERAD besitzt wurde der Abbau von zwei weiteren Substraten in Cdc48p Mutanten gemessen. Dabei wurde das *CDC48* Wildtyp-Gen auf dem Chromosom durch das Mutantenallel *cdc48*^{Y834E} ersetzt. Der Abbau von CTG* und CT* ist in diesen Zellen defekt. Dies zeigt, dass der Komplex aus Cdc48p, Ufd1p und Npl4p für den Abbau eines breiten Substratspektrums benötigt wird (Abbildung 17 A und B).

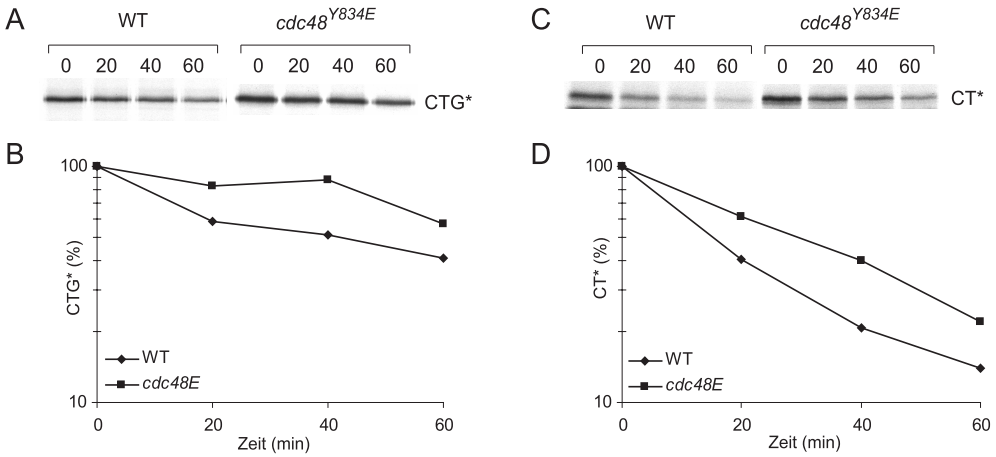


Abbildung 17: Cdc48p ist allgemein in den Abbau von ungefalteten Proteinen aus dem ER involviert. Der Abbau von CTG* und CT* wurde in Wildtypzellen und Cdc48Ep exprimierenden Mutantenzellen durch „pulse-chase“ Analyse bestimmt.

Vergleich der Substrate CPY*, CT* und CTG* in Bezug auf Komponenten der ERAD-Abbaumaschinerie

	CPY*	CT*	CTG*
Proteasom	+[1]	+	+
Ubc1p (E2)	+[2]	+	+
Ubc6p (E2)	+[1]	n.u.	n.u.
Ubc7p (E2)	+[1]	+	+
Der3/Hrd1p (E3)	+[3]	+	+
Kar2p	+[4]	-	-
Sec61p	+[4]	?	?
Cdc48p	+	+	+
Ufd1p	+	n.u.	n.u.
Npl4p	+	n.u.	n.u.
Ufd3p	+	n.u.	n.u.
Ssa-Familie (Hsp70)	-[5]	-	+
Ydj1p (Hsp40)	-[5]	-	-
Ygl128p (Hsp40)	-[6]	n.u.	+
Ypr61p (Hsp40)	n.u.	n.u.	+
Hlj1p (Hsp40)	n.u.	n.u.	+

+: in den Abbau involviert; -: für den Abbau nicht notwendig; ?: keine Entscheidung möglich; n.u.: nicht untersucht

[1]Hiller et al., 1996; [2]Friedländer et al., 2000; [3]Bordallo et al., 1998; [4]Plemper et al., 1997; [5]Deak, 2001; [6]R. Hitt, unveröffentlichtes Ergebnis

ERAD und sekretorischer Weg

Proteintransport zwischen dem ER und Golgi Apparat ist zum Abbau von CPY* notwendig

Im Rahmen der Untersuchungen zur Abhängigkeit des Abbaus von CPY* von der AAA-ATPase Cdc48p und ihren interagierenden Komponenten wurde als Kontrolle untersucht, ob auch das mit Cdc48p interagierende Protein Ufe1p beim Abbau von CPY* eine Rolle spielt. Überaschenderweise war dies der Fall (Abbildung 18 A). Ufe1p bildet mit Cdc48p einen Komplex, der zur homotypischen Fusion von ER Membranen nötig ist (Latterich et al., 1995; Patel et al., 1998). Ufe1p ist aber auch für den anterograden und retrograden Proteintransport zwischen ER und Golgi notwendig (Lewis und Pelham, 1996; Lewis et al., 1997). Aufgrund des überraschenden Ergebnisses dieses Kontrollversuchs wurde der Einfluss des sekretorischen Systems auf den Abbau von CPY* genauer untersucht.

Beteiligung von Proteinen an ERAD, die für den anterograden Transport notwendig sind

Der Abbau von CPY* wurde in mehreren Mutanten mit Defekten im ER-Golgi Transportweg untersucht. Die in den Mutanten betroffenen Proteine sind in verschiedene Schritte des Transportes involviert. Untersucht wurden Mutanten mit Defekten in der COPII-Vesikel Bildung (Sec23p (Campbell und Schekman, 1997), Sec12p (Campbell und Schekman, 1997) und Sed4p (Gimeno et al., 1995)). Weiterhin wurde untersucht, ob Defekte in der Vesikelfusion mit dem Golgi-Apparat (Sed5p (Banfield et al., 1995)) oder dem ER (Ufe1p (Lewis und Pelham, 1996; Lewis et al., 1997)) den Abbau von CPY* beeinflussen. Die Mutation in Ufe1p beeinflusst indirekt auch den anterograden Transport aus dem ER, da die COPII-Vesikel Produktion gestört wird (Lewis und Pelham, 1996). Ufe1p wird noch zusätzlich bei der Fusion von ER Membranen benötigt (Patel et al., 1998), doch diese Funktion scheint nicht für den Defekt im CPY* Abbau verantwortlich zu sein (siehe unten). Ein weiteres Protein, Sec18p, ist allgemein bei der Fusion von Transportvesikeln mit dem Zielorganell beteiligt (Graham und Emr, 1991; Lewis et al., 1997).

Abbildung 18 A und B zeigen, dass in *sec23-1, ufe1-1, sed5-1, sec12-1* und *sec18-1* Stämmen der Abbau von CPY* defekt ist. Die Halbwertszeit von CPY* ist in diesen Stämmen ungefähr 2-fach (*sec12-1, sec23-1, sed5-1*), 6-fach (*ufe1-1*) und 7-fach (*sec18-1*) gegenüber der in Wildtypzellen verlängert. Die Unterschiede in den Halbwertszeiten sind nicht ohne weiteres erklärbar, da der ER-Golgi Transport von Proteinen in allen Stämmen vollständig verhindert ist (Hardwick und Pelham, 1992; Lewis und Pelham, 1996; Stevens et al., 1982). Der vollständige Proteintransportdefekt in den einzelnen Mutanten wurde durch Verfolgung der Reifung der Proteinase yscA (PrA), eines Enzyms, welches über das ER in die Vakuole transportiert wird,

bestätigt. In den Mutantenstämmen tritt nach 60 min keine reife PrA auf, eine Ausnahme bildet nur der *ufe1-1* Stamm, bei dem eine minimale Menge an reifer PrA sichtbar ist (Abbildung 18 C und D). Es gibt also keine Korrelation zwischen der Schwere des Proteintransportdefekts und der Verlängerung der Halbwertszeit von CPY* in den einzelnen Mutanten.

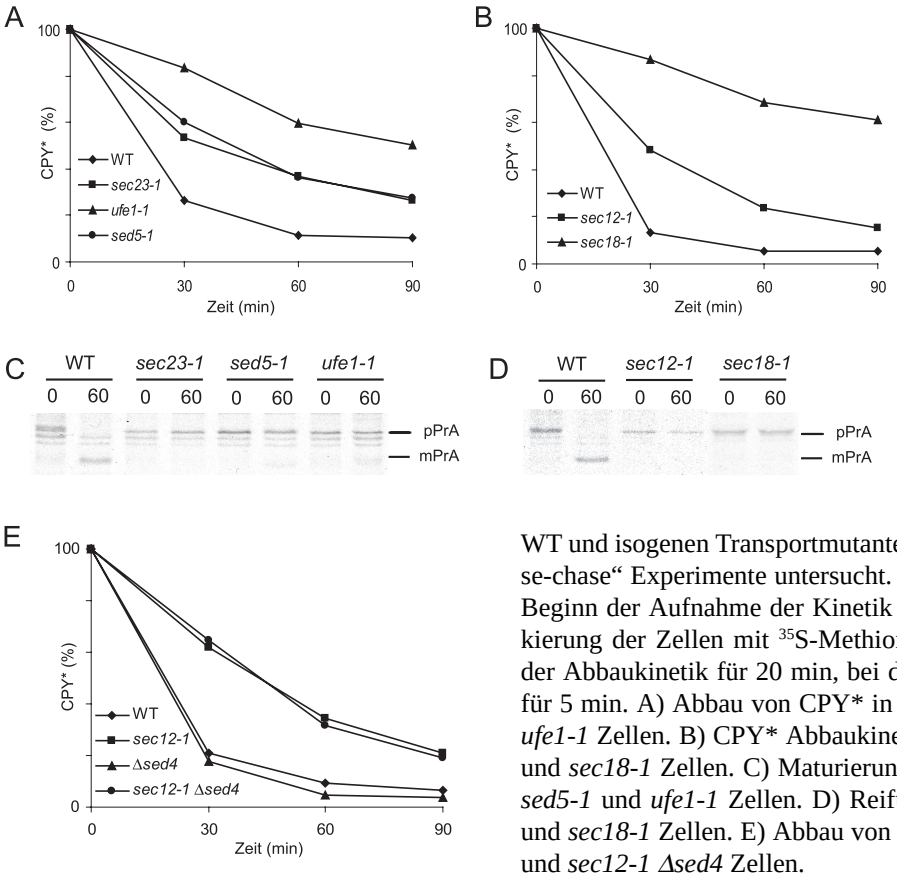


Abbildung 18: Der Abbau von CPY* ist bei blockiertem Transport vom ER zum Golgi gestört. Die Abbaukinetik von CPY* und die Maturierung von PrA in WT und isogenen Transportmutantenstämmen wurde durch „pulse-chase“ Experimente untersucht. Die Zellen wurden 5 min vor Beginn der Aufnahme der Kinetik auf 37°C gebracht. Die Markierung der Zellen mit ^{35}S-Methionin erfolgte bei der Messung der Abbaukinetik für 20 min, bei der Messung der PrA Reifung für 5 min. A) Abbau von CPY* in WT und *sec23-1*, *sed5-1* und *ufe1-1* Zellen. B) CPY* Abbaukinetik gemessen in WT, *sec12-1* und *sec18-1* Zellen. C) Maturierungsdefekt von PrA in *sec23-1*, *sed5-1* und *ufe1-1* Zellen. D) Reifung von PrA in WT, *sec12-1* und *sec18-1* Zellen. E) Abbau von CPY* in WT, *sec12-1*, *Δsed4* und *sec12-1 Δsed4* Zellen.

Der Abbau von CPY* in *sec18-1* Mutanten wurde bisher schon zweimal mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht (Finger et al., 1993; Teichert et al., 1989). Mit den Ergebnissen aus Abbildung 18 B kann man wohl abschließend von einem defekten CPY* Abbau in diesem Mutantenstamm ausgehen.

Da der Abbau von CPY* in den verschiedenen Transportmutanten so unterschiedlich verläuft, wurde überprüft, ob überlappende Funktionen homologer Proteine diesen Effekt hervorrufen könnten. Sed4p ist ein zu Sec12p verwandtes Protein, das auch an der Vesikelbiogenese am ER beteiligt ist (Gimeno et al., 1995). Der Einfluss von Sed4p wurde entweder allein oder zusammen mit einer Sec12p Mutation im „pulse-chase“ Experiment untersucht; in keinem Fall konnte eine Änderung der Halbwertszeit von CPY* gegenüber dem jeweiligen Stamm mit funktionellem Sed4p festgestellt werden (Abbildung 18 E).

Der Defekt des Abbaus von CPY* in den Sekretionsmutanten könnte durch einen unspezifischen Defekt, der in allen Mutanten mit defekter Sekretion auftritt, hervorgerufen werden. So ist z. B. bekannt, dass alle *sec* Mutanten ihre ribosomale RNA abbauen, nachdem sie auf restriktive Temperatur gebracht wurden (Mizuta und Warner, 1994). Um solche Effekte auszuschlie-

ßen, wurde ein Sec1p Mutantenstamm im „pulse-chase“ Experiment auf Abbau von CPY* bei restriktiven Bedingungen untersucht. Sec1p wurde gewählt, weil es an der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran beteiligt ist (Aalto et al., 1997; Novick und Schekman, 1979). Es wurde keine Änderung der CPY* Halbwertszeit gefunden (Abbildung 19). Daraus lässt sich schließen, dass der Abbau von CPY* nicht von funktioneller Sekretion abhängt. In den ER-Golgi Proteintransportmutanten liegen somit spezifische Defekte vor, die den Abbau von CPY* in diesen Mutanten verhindern.

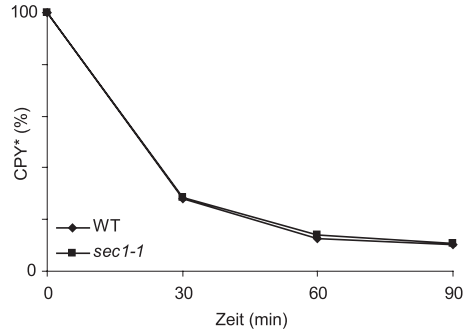


Abbildung 19: Der Abbau von CPY* ist bei defekter Sekretion in *sec1-1* Zellen nicht beeinflusst. Die CPY* Abbaukinetik wurde durch „pulse-chase“ Analyse gemessen. Die Zellen wurden 20 min vor Beginn der Kinetik auf 37°C gebracht.

Genetische Interaktion zwischen Ufe1p und Sec18p

Homotypische Fusionen von ER Membranen und heterotypische Fusionen von COPI Vesikeln mit der ER Membran benötigen Ufe1p, das t-SNARE des ER. Die AAA-ATPasen, die als Partner von Ufe1p agieren, sind bei der homotypischen Fusion Cdc48p und bei der Vesikelfusion Sec18p (Lewis et al., 1997; Patel et al., 1998). Durch Überexpression von Cdc48p kann man die Temperatursensitivität von *ufe1-1* Zellen aufheben (Patel et al., 1998), der Abbaudefekt von CPY* ändert sich unter diesen Bedingungen jedoch nicht (Abbildung 20 A). Überexpression von Sec18p ändert nichts an der Temperatursensitivität von *ufe1-1* Zellen bei 37°C (nicht gezeigt), wohingegen der Abbau von CPY* etwas beschleunigt wird (Abbildung 20 B).

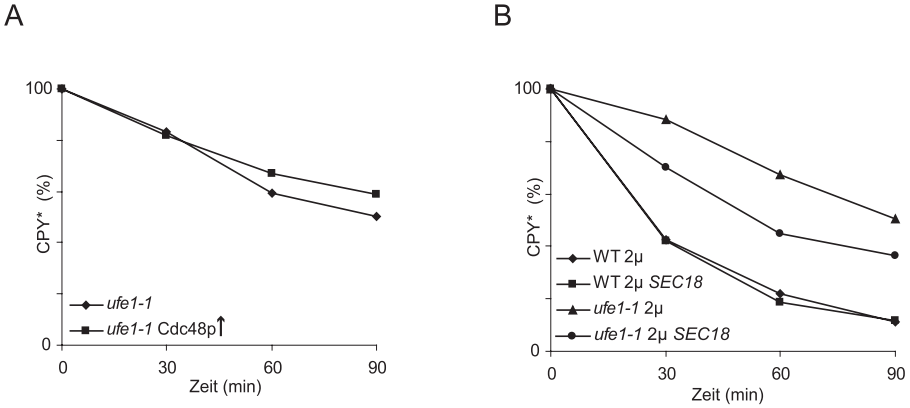


Abbildung 20: A) Überexpression von Cdc48p in *ufe1-1* Zellen ändert nichts an der Abbaukinetik von CPY* bei 37°C. *ufe1-1* Zellen mit oder ohne YEpCDC48 (P_{GAL1}*::CDC48*) wurden auf Glukose bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, gewaschen, für 3 h in CM Medium mit 2% Galaktose inkubiert und danach die CPY* Degradation im „pulse-chase“ Experiment gemessen. Die „labeling“ und „chase“ Medien enthielten 0,1% Galaktose. B) Überexpression von Sec18p in *ufe1-1* Zellen beschleunigt den Abbau von CPY* bei 37°C. WT und *ufe1-1* Zellen wurden mit einem 2µ Plasmid (pRS426) oder einem 2µ Plasmid mit dem *SEC18* Gen (pWO152) transformiert und die CPY* Abbaukinetik durch „pulse-chase“ Analyse gemessen.

Einfluss des UPR (zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine im ER) auf den Abbau von CPY bei defektem anterograden Transport*

Durch die DNA-Mikroarray-Technik konnten Travers und Kollegen, 2000, zeigen, dass die Expression vieler in den sekretorischen Prozess involvierter Proteine erhöht wird, wenn ungefaltete Proteine im ER vorliegen. So wird z. B. die Expression von Sec23p erhöht, wohingegen die Expression von Ufe1p nicht beeinflusst wird (Travers et al., 2000). Um zu untersuchen, ob zwischen der UPR und Sekretionsdefekten ein Zusammenhang beim Abbau von CPY* besteht, wurden Doppelmutanten aus *Δire1* und *sec23-1* bzw. *ufe1-1* hergestellt und mit „pulse-chase" Experimenten die Abbaukinetik von CPY* bestimmt. In *Δire1* Zellen verläuft der Abbau von CPY* bei 30°C wie im Wildtyp (Friedländer et al., 2000), bei 37°C ist der Abbau jedoch gestört. In den Doppelmutanten findet praktisch überhaupt kein Abbau mehr statt (Abbildung 21 A und B). Da die Verhinderung des Proteintransports aus dem ER zu einer drastischen Erhö-

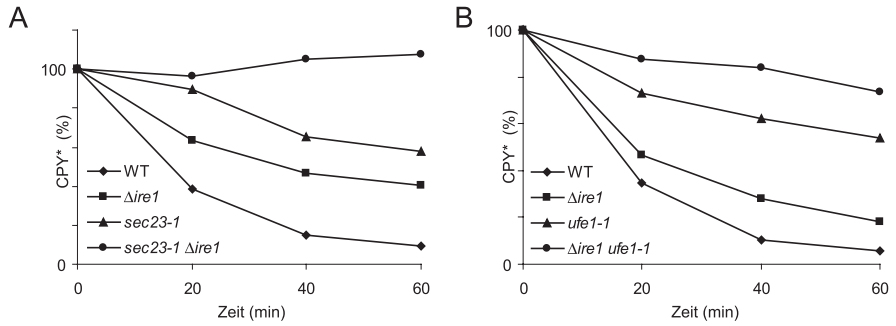


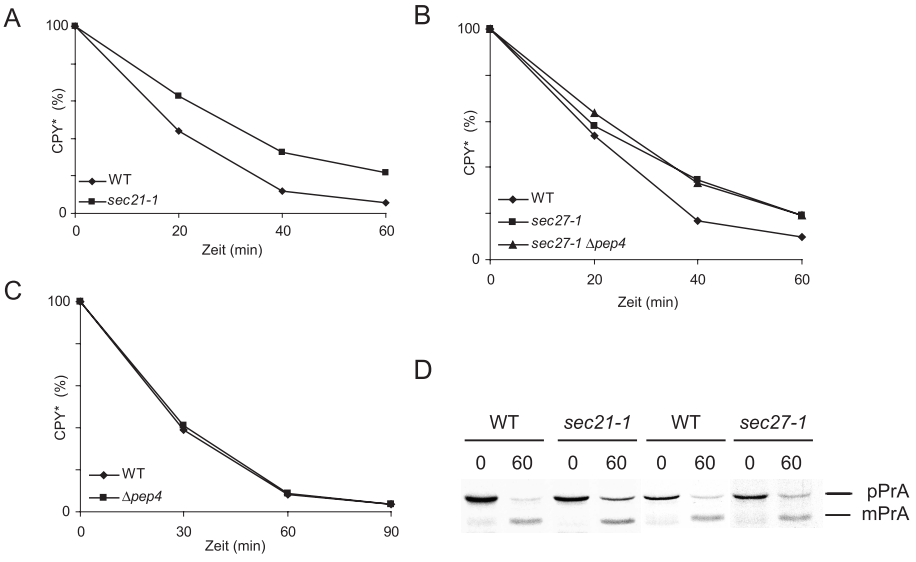
Abbildung 21: Kombination von Defekten im UPR und dem Transport zwischen ER und Golgi führen zu praktisch blockiertem Abbau von CPY*. A) Abbaukinetik von CPY* in WT, *sec23-1*, *Δire1* und *sec23-1 Δire1* Zellen. B) CPY* Abbau in WT, *ufe1-1*, *Δire1* und *ufe1-1 Δire1* Zellen. Für die „pulse-chase" Analysen in A) und B) wurden die Zellen jeweils 5 min vor Beginn der Kinetik auf 37°C transferiert.

hung der Proteinmenge im ER führt, erhöht die Zelle die Chaperonmenge im ER, damit ER-Funktionen wie ERAD ablaufen können. Dies ist vor allem für den Abbau von CPY* wichtig, weil hierfür Chaperone wie Kar2p essenziell sind (Plemper et al., 1997).Wird der Zelle die Möglichkeit zur Erhöhung der Chaperonmenge im ER genommen, weil Ire1p fehlt und damit die UPR inaktiviert ist, ist die Kar2p Menge im ER nicht mehr ausreichend und der Abbau von CPY* ist praktisch verhindert.

Retrograder Transport und CPY Abbau*

Folgendes Modell könnte die bisherigen experimentellen Daten erklären. CPY* wird erst vom ER zum Golgi transportiert, dort modifiziert, gelangt dann zurück zum ER und wird dort durch das Translokon zum Proteasom gebracht. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein Protein, das zum Abbau von CPY* notwendig ist, im Golgi modifiziert werden muss, um volle Aktivität im ER entfalten zu können. Nach diesen Modellen müsste der retrograde Transport vom Golgi zum ER den gleichen Einfluss auf den Abbau von CPY* haben wie der anterograde Transport. Um

dies zu überprüfen, wurde die Halbwertszeit von CPY* in *sec21-1* und *sec27-1* Zellen untersucht, die bei restriktiver Temperatur Defekte in der COPI Vesikelbiogenese aufweisen (Duden et al., 1994; Hosobuchi et al., 1992; Letourneur et al., 1994). In *sec21-1* und *sec27-1* Zellen ist der Abbau von CPY* jedoch nur leicht gestört (Abbildung 22 A und B). Um auszuschließen, dass CPY* bei defektem retrogradem Transport zur Vakuole gelangt und dort abgebaut wird, wurde in dem *sec27-1* Stamm das *PEP4* Gen zerstört und damit vakuolärer Proteinabbau ausgeschaltet (Knop et al., 1993; Van Den Hazel et al., 1996). Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die CPY* Degradation (Abbildung 22 B). Defekter vakuolärer Abbau allein hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von CPY* (Abbildung 22 C).



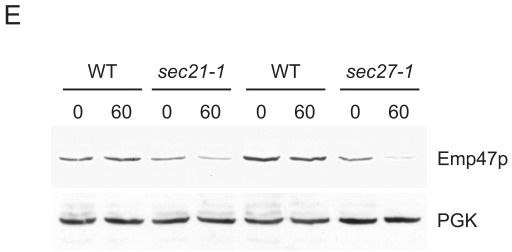


Abbildung 22: Defekte im retrograden Transport vom Golgi zum ER haben kaum Einfluss auf den Abbau von CPY*. Der Abbau von CPY* wurde durch „pulse-chase“ Analyse untersucht. Die Zellen für Abbildung A) und B) wurden bei 25°C angezogen und 60 min vor Beginn der Kinetik auf 37°C gebracht. A) Abbau von CPY* in WT und *sec21-1* Zellen. B) CPY* Abbau in WT, sec27-1 und *sec27-1 Δpep4* Zellen. C) Abbau von CPY* in WT und *Δpep4* Zellen. Die Zellen wurden bei 30°C angezogen. D) Maturierung von PrA in *sec21-1*, *sec27-1* und den korrespondierenden WT Zellen. Die Zellen wurden wie für A) behandelt. E) Der retrograde Transport ist in *sec21-1* und *sec27-1* Zellen unter den gewählten Bedingungen defekt. Der Abbau von Emp47p wurde in einem „Cycloheximid-chase“ Experiment verfolgt. Gleiche Mengen Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (in Minuten) lysiert und im Immunoblot analysiert. PGK diente als Ladekontrolle.

Um die verwendeten temperatursensitiven Hefestämme in ihren Transportdefekten zu überprüfen, wurden Reifung von PrA und Stabilität von Emp47p untersucht. Für *sec21-1* und *sec27-1* Stämme ist ein leichter anterograder Transportdefekt in der Literatur beschrieben (Letourneur et al., 1994). Nach Messung der PrA Reifung wurde gefunden, dass in Wildtypzellen nach 60 min 80 % der PrA in der reifen Form vorliegt, im *sec21-1* Stamm 64 % und im *sec27-1* Stamm 74 %. Dies zeigt, dass der anterograde Transport unter den gewählten Bedingungen in den Mutantenstämmen leicht defekt war (Abbildung 21 D). Um den retrograden Transport zu überprüfen,

wurde die Stabilität von Emp47p gemessen. Emp47p ist ein Golgi Protein, das zur korrekten Lokalisation COPI Vesikeltransport benötigt. Ist dieser Transport gestört, wird Emp47p in die Vakuole misslokalisiert und dort abgebaut (Schröder et al., 1995). Wie aus Abbildung 21 E ersichtlich, wurde Emp47p in den Mutantenstämmen destabilisiert.

Trotz der Defekte im COPI Vesikel Transport wird der CPY* Abbau nur leicht gestört. Das Transportmodell, welches von andern Gruppen vorgeschlagen wurde (Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001), bei dem CPY* oder ein zum Abbau benötigtes Protein zum Golgi und zurück transportiert werden muss, deckt sich daher nicht mit den hier erhobenen experimentellen Daten.

CPY* entkommt bei defekter Abbaumaschinerie der ER Qualitätskontrolle

Der Einfluss des Transportes zwischen ER und Golgi auf den Abbau von CPY* wäre auch mit der Existenz eines speziellen Kompartimentes für den Abbau zu erklären, das nur per vesikulärem Transport erreicht werden kann und von dem aus die Retrotranslokation ins Zytosol stattfindet. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde CPY*-HA in Wildtyp- und *Δder1* Zellen mittels Elektronenmikroskopie und Immunogold-Markierung lokalisiert. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel vom Max-Delbrück-Centrum (MDC) Berlin Buch durchgeführt. Die Lokalisationsstudien konnten leider nicht mit CPY* durchgeführt werden, da mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern keine Aussagen über die Lokalisation von CPY* möglich war (nicht gezeigt). CPY*-HA verhält sich beim Abbau wie CPY*, nur die Halbwertszeit ist etwas verlängert (nicht gezeigt).

Lokalisierung von CPY-HA mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen*

Wie aud Abbildung 23 A ersichtlich, ist CPY*-HA in Wildtypzellen im kernnahen und peripheren ER lokalisiert, die weiteren Organellen des sekretorischen Systems sind praktisch ohne Goldmarkierung. Dies entspricht den Ergebnissen, die durch Immunfluoreszenz erhalten wurden (Finger et al., 1993). Die Lokalisation von CPY* in *Δder1* Zellen wurde untersucht, um zu überprüfen ob CPY* bei defektem Abbau in einem neuen Kompartiment akkumuliert. Der größte Teil von CPY*-HA war wie beim Wildtyp im kernnahen und peripheren ER lokalisiert. Zusätzlich wurde CPY*-HA jedoch auch im Golgi Apparat, der Vakuole und sezerniert, außerhalb der Zelle gefunden (Abbildung 23B und C). Zur Spezifitätskontrolle der Immunogoldkomplexe wurden Wildtypzellen, die kein CPY*-HA exprimierten, verwendet. In diesen Zellen wurde nur wenig Goldmarkierung im Zytosol und im Kern gefunden; an Membranstrukturen trat keine Markierung auf (Abbildung 23 D).

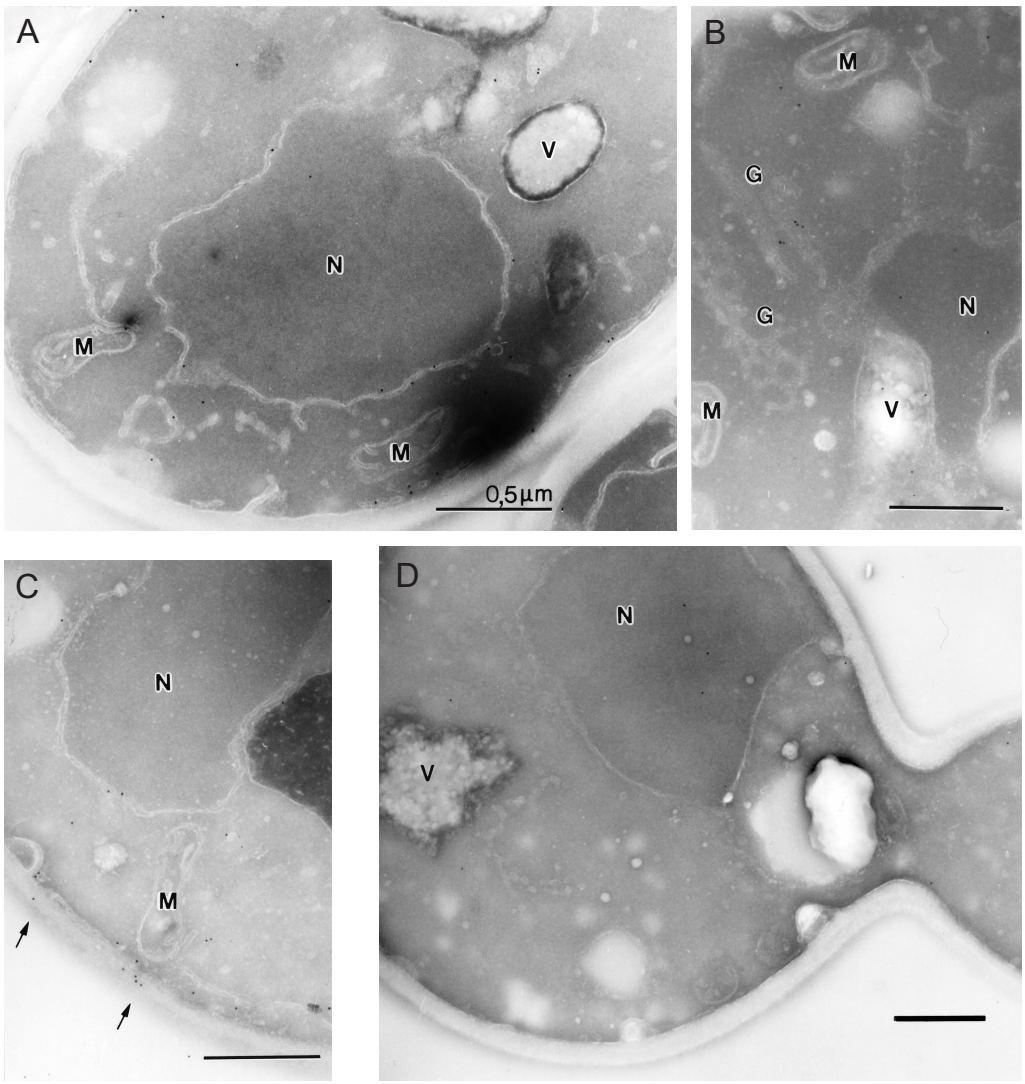


Abbildung 23: Lokalisierung von CPY*-HA durch elektronenmikroskopische Aufnahmen. Ultra dünne Schnitte von CPY*-HA exprimierenden WT (A) und *Δder1* Zellen (B und C) oder als Kontrolle WT Zellen (D) wurden mit αHA Antikörpern und αMaus-Gold Komplexen (12 nm) behandelt. Die Zellen in A), B) und C) wurden mit Plasmid pCT52 transformiert, die Expression von CPY*-HA wurde 3 h lang durch Zugabe von Kupfersulfat (100 µM Endkonzentration) zum Wachstumsmedium induziert. N: Zellkern; M: Mitochondrium; V: Vakuole; G: Golgi Elemente. Die Balkenlänge entspricht 500 nm. A) In WT Zellen ist CPY*-HA im kernnahen und peripheren ER lokalisiert. B) CPY*-HA ist in *Δder1* Zellen in Strukturen des sekretorischen Weges verteilt. C) *Δder1* Zellen sezernieren CPY*-HA. D) Kontrolle zur Erkennung einer unspezifischen Reaktion des benutzten Antikörpers in WT Zellen.

*Sekretion von CPY**

Um die Befunde aus der Elektronenmikroskopie zu überprüfen, wurde biochemisch untersucht, ob CPY* aus der Zelle sezerniert wird. Das Medium von Wildtyp, *Δder1* und *Δder3/hrd1* Zellen wurde im Western Blot auf Anwesenheit von CPY* überprüft. In Wildtypzellen ist die sezernierte Menge an CPY* wesentlich geringer als in *Δder1* und *Δder3/hrd1* Zellen (Abbildung 24). Die CPY* Menge im Medium ist anteilsmäßig größer als die von Kar2p, da das Signal von Kar2p in der sezernierten Fraktion wesentlich schwächer ist als in der zellulären Fraktion, wo-

hingegen das Signal von CPY* in beiden Fraktionen ungefähr gleich stark ist (Abbildung 24). Kar2p wird ins Medium sezerniert, wenn der HDEL Rückhalteweg überlastet ist (Belden und Barlowe, 2001).

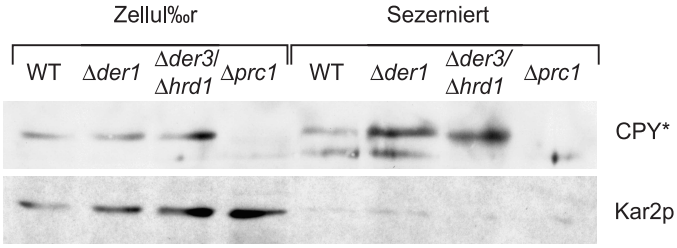


Abbildung 24: CPY* wird ins Wachstumsmedium sezerniert. Die Gleichgewichtsmenge an zellulärem und sezerniertem CPY* wurde in WT, *Δder1*, *Δder3/hrd1* und *Δprc1* Zellen im Immunoblot untersucht. Auf der gleichen Membran wurde anschließend Kar2p detektiert. In den sezernierten Fraktionen wurde ungefähr die fünffache Menge an Protein geladen.

Beteiligung der Vakuole am Abbau von CPY in Δder1 Zellen*

Um zu zeigen, dass CPY* bei blockiertem Abbau in die Vakuole transportiert wird, wurden „pulse-chase“ Experimente mit defekter vakuolärer Proteolyse in *Δder1* Zellen durchgeführt. Der Abbau von CPY* wurde mit Zellen verglichen, die einen intakten vakuolären Abbau besitzen. Zwischen Wildtyp und *Δpep4* Zellen wurde kein Unterschied gefunden, der Abbau von CPY* war in *Δder1 Δpep4* Doppelmutanten jedoch langsamer als in *Δder1* Zellen (Abbildung 25).

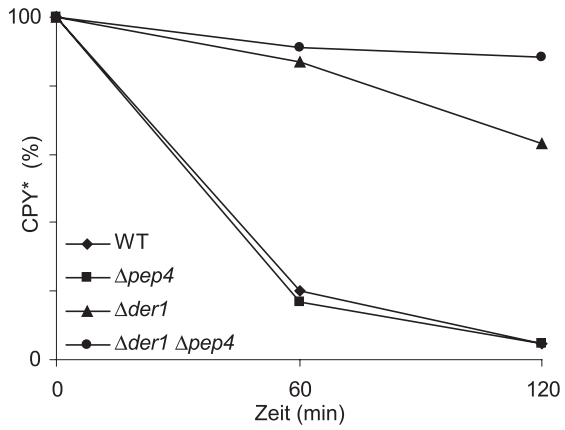


Abbildung 25: Hydrolyse in der Vakuole trägt zum Abbau von CPY* in *Δder1* Zellen bei. Die Abbaukinetik von CPY* wurde in WT, *Δpep4*, *Δder1* und *Δder1 Δpep4* Zellen durch „pulse-chase“ Analyse ermittelt.

Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie (Abbildung 23), der Versuch zur Sekretion (Abbildung 24) und das „pulse-chase“ Experiment (Abbildung 25) zeigen, dass CPY* in den Golgi Apparat und darüber hinaus entkommt, wenn der Abbau defekt ist. Diese Befunde ergänzen die Ergebnisse von M. Knop, der in *Δder1* Stämmen CPY* mit Golgi-typischer Glykosylierung gefunden hatte (Knop et al., 1996a).

Morphologie des sekretorischen Weges in ERAD blockierten Mutantenstämmen

In Mutantenstämmen mit blockiertem ERAD, z. B. *Δder1* oder *Δder3/hrd1* ist die Expression der Proteine erhöht, die vor ungefalteten Proteinen im ER schützen. Die exprimierten Proteine haben viele Funktionen, darunter fallen Proteinabbau, Chaperone, Sekretion und Lipidsynthese (Travers et al., 2000). Um zu untersuchen, ob diese Änderungen in der Proteinexpression die Zellmorphologie beeinflussen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel (MDC Berlin-Buch) elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp, *Δder1*, *Δder3/hrd1*, *Δhrd3*, *der4-1*, *Δpmr1*, *der6-1*, *der7-1* und *Δder1Δire1* Zellen angefertigt.

Proliferation des ER

Mutantenzellen mit Defekten im CPY* Abbau proliferieren das ER, sie besitzen mehr zytosolisches und peripheres ER als Wildtypzellen (Abbildung 26 A, B und Daten nicht gezeigt). Dies gilt vor allem für Mutantenzellen wie *Δder1*, *Δder3/hrd1*, *Δhrd3* und *der6-1*, die einen starken Defekt im Abbau von CPY* aufweisen und weniger für *Δpmr1* Zellen, in denen die Halbwertszeit von CPY* nur etwas verlängert ist. In *der4-1* und *der7-1* Zellen ist das ER leicht proliferiert (nicht gezeigt).

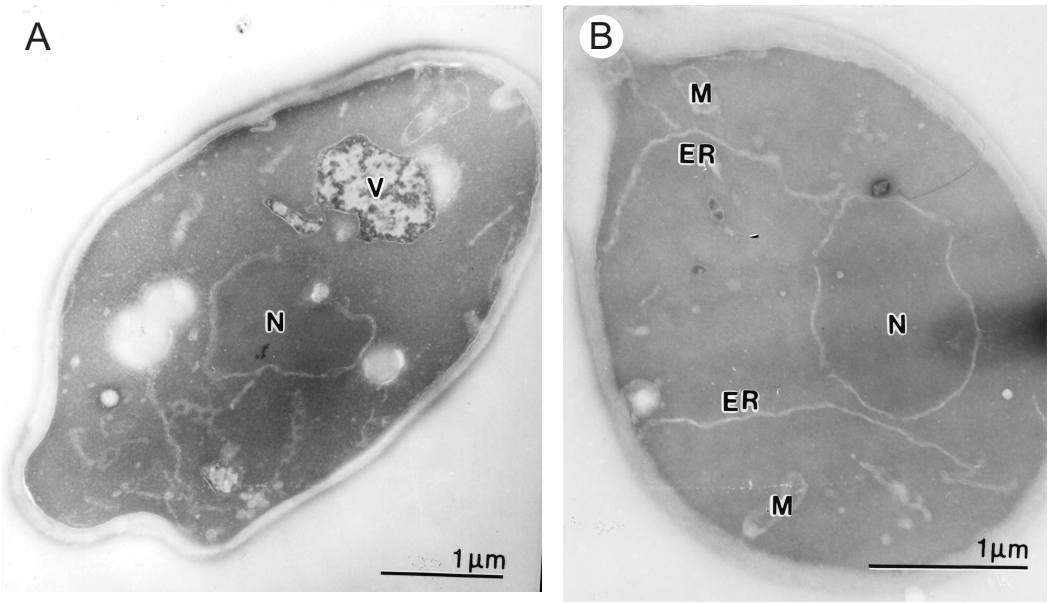


Abbildung 26: Das ER ist in *Δder3/hrd1* Zellen proliferiert. N: Zellkern; ER: endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium; V: Vakuole. Die Balkenlänge entspricht 1000 nm. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer typischen WT Zelle. B) Aufnahme einer *Δder3/hrd1* Zelle im Elektronenmikroskop.

Die Proliferation des ER nimmt dramatische Ausmaße an, wenn CTG* in *Δder3/hrd1* Zellen exprimiert wird, in denen der Abbau blockiert ist (Abbildung 27 B). Es können mehrere Schichten an zisternalem ER beobachtet werden, die sich quer durch das Zytosol ziehen (Abbildung 27 A). Das periphere ER an der Plasmamembran ist ebenso proliferiert. Auch hier können nebeneinander liegende ER Schichten beobachtet werden (Abbildung 27 C). Die Veränderungen sind

sehr wahrscheinlich die Reaktion auf die Expression von CTG*, da dieses Substrat vor allem in den proliferierten ER Strukturen lokalisiert, weniger im kernnahen ER (Abbildung 27 A, B und C). Wildtypzellen zeigen nur geringe Proliferation des ER, wenn CTG* exprimiert wird (nicht gezeigt).

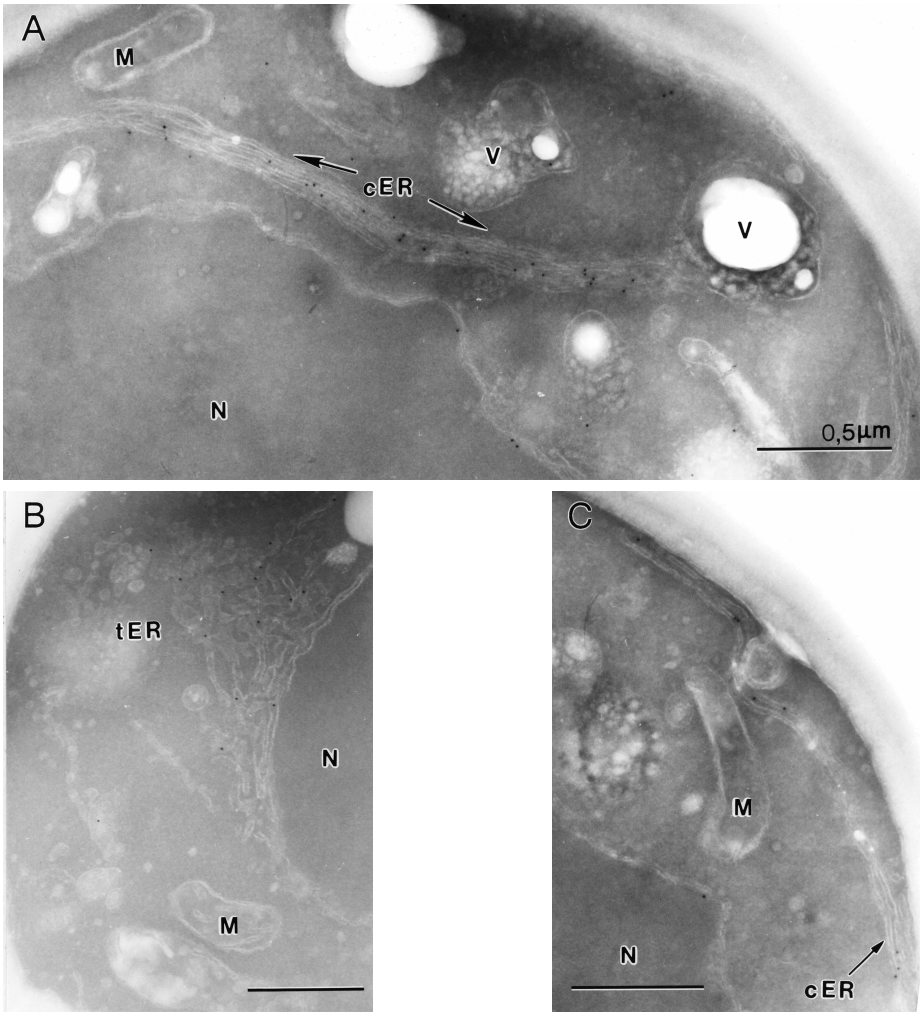


Abbildung 27: Bei der Expression von CTG* in *Δder3/hrd1* Zellen kommt es zu sehr starker Proliferation des ER. Ultra dünne Schnitte von *Δder3/hrd1* Zellen wurden mit αGFP Antikörpern und αMaus-Gold Komplexen (12 nm) behandelt.
N: Zellkern; cER: zisternales ER; tER: tubuläres ER; M: Mitochondrium; V: Vakuole. Die Balkenlänge entspricht 500 nm.

Wenn den Zellen die Möglichkeit fehlt den UPR zu aktivieren, wird das ER auch nicht vergrößert: *Δder1 Δire1* Doppelmutanten zeigen die gleiche Morphologie wie Wildtypzellen, es ist keine Proliferation des ER beobachtbar (Abbildung 28).

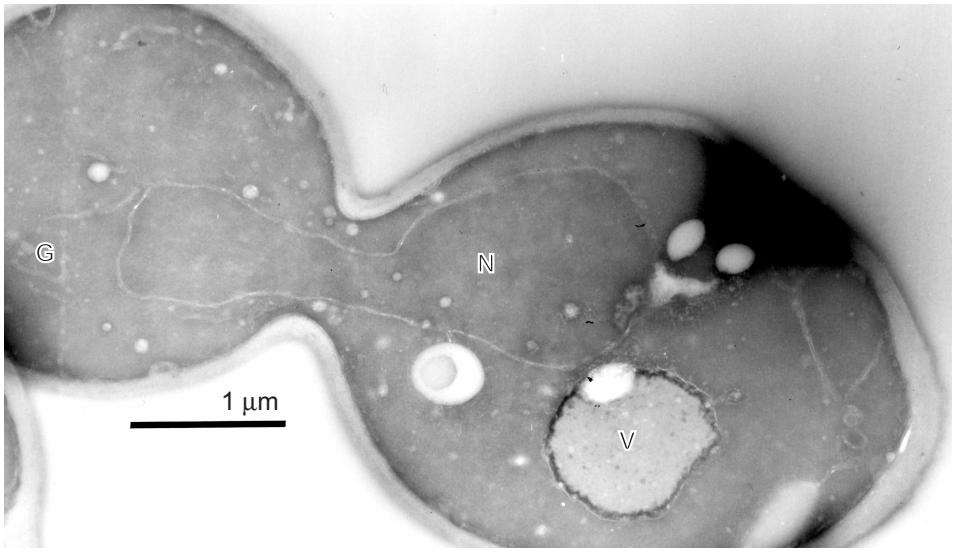


Abbildung 28: In *Δder1 Δire1* Doppelmutanten tritt keine Proliferation des ER und keine Veränderung des Golgi Apparates auf. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Δder1 Δire1* Zelle. N: Zellkern; G: Golgi; V: Vakuole. Die Balkenlänge entspricht 1000 nm.

Änderungen im Golgi Apparat

In Zellen mit Defekten im ER Abbau treten vermehrt Änderungen in der Morphologie des Golgi Apparates auf. Die Zisternen sind aneinander gelagert und das Aussehen erinnert an die Morphologie in höheren Eukaryonten. Dies tritt vor allem in *Δder1*, *Δder3/hrd1*, *Δhrd3* und *der6-1* Mutantenzellen auf (Abbildung 29 A und B).

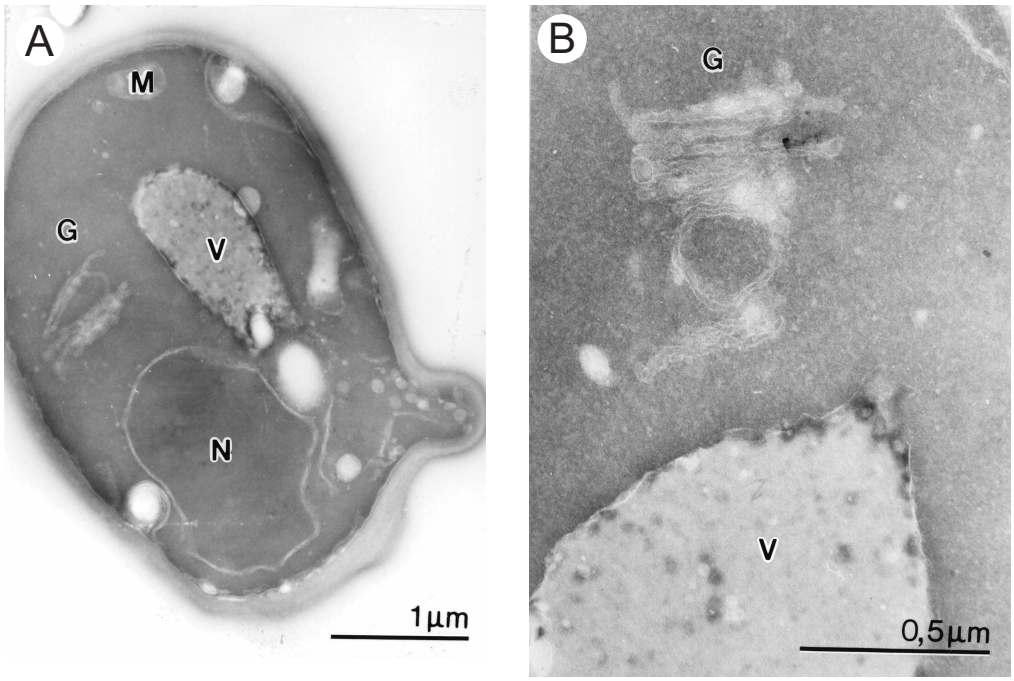
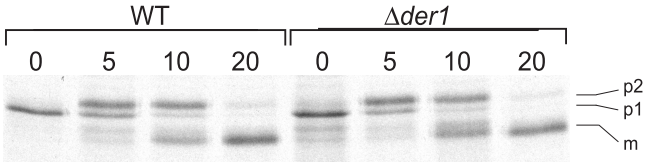


Abbildung 29: Die Morphologie des Golgi Apparates ist in Zellen verändert, die defekt im Abbau von ungefalteten Proteinen aus dem ER sind. N: Zellkern; M: Mitochondrium; V: Vakuole; G: Golgi Elemente. A) Aufnahme einer *Δder3/hrd1* Zelle im Elektronenmikroskop. Die Länge des Balkens entspricht 1000 nm. B) Ausschnitt aus einer *Δder1* Zelle. Die Balkenlänge entspricht 500 nm.

Einfluss von ERAD auf den Transport durch das sekretorische System

Die morphologischen Veränderungen des ER und des Golgi Apparates in ERAD Mutanten und die Präsenz von ungefalteten Proteinen könnten Auswirkungen auf den Transport durch das sekretorische System haben. Um dies zu untersuchen, wurde die Biogenese von CPY in Wildtyp und *Δder1* Zellen verfolgt. Der Transport von CPY durch das sekretorische System lässt sich anhand der Zuckermodifikationen im ER, dem Golgi und der Maturierung zur aktiven Protease in der Vakuole leicht verfolgen. Nach dem posttranslationalen Transport von Pre-pro-CPY ins ER wird die Signalsequenz abgeschnitten und CPY an 4 Stellen glykosyliert. Das Molekulargewicht der Pro-CPY im ER (p1CPY) beträgt 67 kDA. Im Golgi Apparat werden die Zuckerketten modifiziert und das Molekulargewicht erreicht 69 kDa (p2CPY). Nach dem Transport in die Vakuole wird die Pro-CPY zum aktiven Enzym gereift und ist dann 61 kDa schwer (mCPY) (Rendueles und Wolf, 1988). Der Transport von CPY ist in *Δder1* Zellen nicht sonderlich verlangsamt (Abbildung 30 A und B). Das berechnete Verhältnis zwischen mCPY und p2CPY ist in *Δder1* Zellen nicht viel höher als in Wildtyp Zellen (Abbildung 30 B).

A



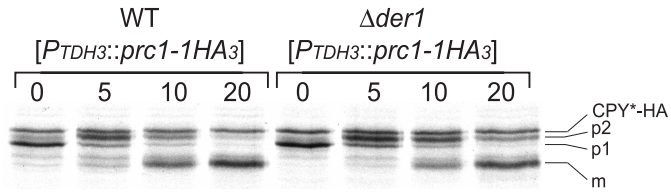
B

Zeit (min)	Verhältnis p2/mCPY WT	Δder1
0	1,0	0,8
5	4,2	6,0
10	1,2	1,4
20	0,2	0,2

Abbildung 30: Vergleich der Maturierung von CPY in WT und *Δder1* Zellen. A) Autoradiogramm zur Maturierung von CPY. Die Zellen wurden für 5 min mit ^{35}S Methionin markiert. Die Positionen von p1 (ER), p2 (Golgi) und m (Vakuole) CPY sind angegeben. B) Berechnetes Verhältnis zwischen m und p2 CPY zu den verschiedenen Zeitpunkten in WT und *Δder1* Zellen.

Wenn zusätzlich zu CPY noch CPY*-HA co-exprimiert wird, geht die Maturierung von p2CPY zu mCPY in *Δder1* Zellen deutlich langsamer vonstatten (Abbildung 31 A). Das Verhältnis zwischen p2CPY und mCPY ist in *Δder1* deutlich höher als in Wildtyp Zellen, dies deutet auf einen verlangsamten Transport durch den Golgi Apparat hin (Abbildung 31 B). Überraschenderweise ist der Export aus dem ER nicht gestört. Es ist kein Unterschied beim Verschwinden der p1CPY zwischen Wildtyp und *Δder1* Zellen feststellbar (Abbildung 31 C) und die Halbwertszeit entspricht dem Transport aus dem ER in Wildtyp Zellen ohne Co-Expression von CPY*-HA oder CPY (nicht gezeigt).

A



B

Zeit (min)	Verhältnis p2/mCPY WT CPY*HA	Δder1 CPY*HA
0	5,3	5,3
5	3,7	10,0
10	0,8	1,9
20	0,2	0,4

C

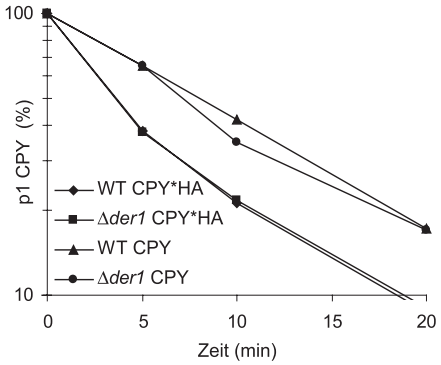


Abbildung 31: Die Maturierung von CPY ist in *Δder1* Zellen gehemmt, wenn zusätzlich CPY*-HA exprimiert wird. A) Autoradiogramm zur Maturierung von CPY. Die Zellen exprimieren zusätzlich CPY*-HA unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors. Die Experimente wurden, wie für Abbildung 30 beschrieben, durchgeführt. Die Positionen von p1 (ER), p2 (Golgi), m (Vakuole) CPY und CPY*-HA sind angegeben. B) Berechnetes Verhältnis zwischen m und p2 CPY zu den verschiedenen Zeitpunkten in CPY*-HA exprimierenden WT und *Δder1* Zellen. C) Kinetik des ER Exports von CPY in WT und *Δder1* Zellen, die zusätzlich CPY*-HA oder CPY exprimieren, im Vergleich.

Wenn man zusätzlich zur chromosomalen Kopie CPY von einem Plasmid (pCT70) unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors exprimiert, wird jeder Schritt der CPY-Biogenese verlangsamt, in Wildtyp wie in *Δder1* Zellen (Abbildung 32). Schon der Transport aus dem ER ist deutlich langsamer (Abbildung 31).

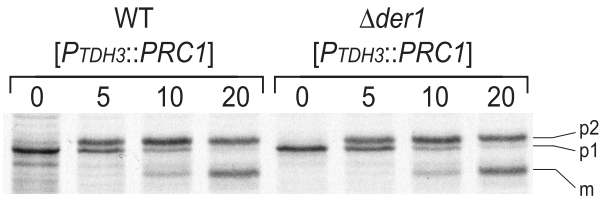


Abbildung 32: Vergleich der Maturierung von CPY in WT und *Δder1* Zellen bei zusätzlicher Expression von CPY im „pulse-chase“ Experiment. Die Zellen exprimieren zusätzlich CPY unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors. Die Experimente wurden, wie für Abbildung 30 beschrieben, durchgeführt. Die Positionen von p1 (ER), p2 (Golgi) und m (Vakuole) CPY sind angegeben.

Die Experimente zur Zellmorphologie und zum Transport von CPY durch das sekretorische System zeigen, dass Defekte in ERAD Auswirkungen auf das sekretorische System haben. Die Morphologie der Organellen ändert sich und der Transport durch das sekretorische System wird gestört.

Diskussion

Unterschiede im Abbau von CPY*, CT* und CTG*

CT* und CTG* sind membrangebundene Varianten des ERAD Modellsubstrates CPY*. Beide können als ungefaltete Modellsubstrate für verschiedene Proteinklassen dienen. CT* repräsentiert lumenal missgefaltete Membranproteine ohne, CTG* mit zytosolischer Domäne. Die Veränderungen des C-Terminus von CPY* durch die Transmembrandomäne führen nicht zu einem weiteren Abbausignal. CT und CTG, die membrangebundener CPY entsprechen, zeigen spezifische CPY Aktivität und werden zu Proteinen in der Größe von reifer CPY prozessiert (Abbildung 5). CT* und CTG* gehören somit zusammen mit CPY* in eine Klasse von missgefalteten Substraten, die alle das gleiche Abbausignal im Lumen des ER aufweisen, aber verschiedene Proteinklassen repräsentieren: CPY* ist ein lösliches Protein, CT* ein Membranprotein ohne zytosolischen Teil und CTG* ein Membranprotein mit einer stabil gefalteten zytosolischen Domäne.

Der Abbau von CT* und CTG* zeigt einige Gemeinsamkeiten mit CPY* (Abbildungen 6, 7, 8, 14 und 17), vor allem in den benötigten Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Ob CT* und CTG*, wie CPY*, durch den Sec61-Kanal ins Zytosol transportiert werden (Plemper et al., 1997), konnte mit den durchgeführten Versuchen nicht eindeutig geklärt werden, da unter den gewählten Versuchsbedingungen Importdefekte ins ER auftraten und deshalb die Exportkinetiken für CT* und CTG* nicht interpretierbar sind (Abbildung 9). Das Proteasom, die Ubiquitin übertragenden Enzyme Ubc1p und Ubc7p, die Ubiquitin-Ligase Der3/Hrd1p und der zum Export benötigte Komplex aus Cdc48p, Ufd1p und Npl4p werden alle zum Abbau von CT* und CTG* benötigt. Diese, im Zytosol agierenden Komponenten des ERAD Systems sind für den Abbau von CPY* und den Membranproteinen CT* und CTG* gleich. Sie stellen vielleicht ein prinzipielles Grundgerüst für den Abbau von missgefalteten Proteinen aus dem ER dar, die eine Mutation und damit eine „Erkennungsdomäne“ für die Qualitätskontrolle im Lumen des ER haben.

Es gibt jedoch noch andere Abbauwege aus dem ER. Im Fall von überschüssigem Vph1p oder Proteinen mit einer Mutation im Zytosol wie der H^+ATPase $Pma1^{D378N}$p wird z. B. das E3 Der3/Hrd1p nicht oder nur teilweise gebraucht. Darüberhinaus sind zum Teil andere E2 Enzyme in Gebrauch (Hill und Cooper, 2000; Wang und Chang, 1999; Wilhovsky et al., 2000). Ubc6p, ebenso ein instabiles Protein, ist in der ER Membran lokalsiert und besitzt praktisch keinen lumenalen Teil. Sein Abbau ist unabhängig vom Translokon sowie unabhängig von Der3/Hrd1p und Hrd3p. Stattdessen wird neben dem Proteasom das E3 Ssm4/Doa10p zur Degradation benötigt (Walter et al., 2001; Swanson et al., 2001).

Neben den oben genannten Gemeinsamkeiten im Abbaumechanismus von CPY*, CT* und CTG* gibt es auch Unterschiede, auf die im Folgenden eingegangen wird. Die Halbwertszeiten der drei Abbausubstrate sind nicht gleich. CT* und CPY* werden ungefähr gleich schnell abgebaut, CTG* jedoch deutlich langsamer. Möglich wäre, dass die Entfaltung der zytosolischen GFP-Domäne in CTG* diese Verlängerung der Halbwertszeit verursacht. CTG* wird im Ganzen abgebaut, es entstehen keine unterschiedlich stabilen Abbau-Intermediate. Es war keine Veränderung der Abbaukinetik zu beobachten, wenn man statt des CPY-Antikörpers GFP-Antikörper im „pulse-chase“ Experiment einsetzte (Daten nicht gezeigt).

Kar2p, das lumenale Chaperon der Hsp70-Familie, wird für den Abbau von CPY* gebraucht (Plemper et al., 1997), nicht jedoch für den Abbau von CT* und CTG* (Abbildung 10). Dies stimmt mit den Befunden von Nishikawa et al., 2001 überein, die berichteten, dass Kar2p zusammen mit den beiden DnaJ-Proteinen Scj1p und Jem1p vor allem CPY* in einem retrotranslokationsbereiten Zustand halten und deshalb für den Abbau von Membranproteinen nicht gebraucht werden (Nishikawa et al., 2001). Da Kar2p nicht für den Abbau von CT* und CTG* gebraucht wird, kann man daraus schließen, dass es für den Abbau von Membranproteinen nicht benötigt wird und auch keine Rolle beim Erkennen der Falschfaltung in CPY* spielt.

Die zytosolischen Hsp70 Chaperone der Ssa-Familie wurden bisher auf ihre Beteiligung beim Abbau von einigen ERAD Substraten hin untersucht. Lösliche Substrate wie CPY* oder deglykosylierter-α-Faktor sind nicht abhängig von funktionellen Chaperonen der Ssa-Familie (Brodsky et al., 1999; Deak, 2001). Beim Abbau von Membranproteinen konnte in Hefe nachgewiesen werden, dass die Chaperonfamilie in den Abbau von überzähligem Vph1p und CFTR involviert ist, nicht jedoch in den Abbau von missgefaltetem Sec61p (Hill und Cooper, 2000; Zhang et al., 2001). Da Sec61p nur wenig zytosolische Bereiche aufweist, Vph1p und CFTR jedoch größere zytosolische Domänen besitzen, führte dies zu dem Modell, dass die Chaperone bei der Entfaltung von zytosolischen Domänen beteiligt sein könnten (Zhang et al., 2001). Die Unterschiede im Abbau von CT* und CTG* zeigen dies noch deutlicher. CT*, das keine zytosolische Domäne aufweist, wird unabhängig von Chaperonen der Ssa-Familie abgebaut, CTG*, das eine stabil gefaltete Domäne im Zytosol besitzt, benötigt zum Abbau diese Chaperone.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Hsp70 Chaperone nicht für die Entfaltung der zytosolischen Domänen zuständig sind, sondern diese nur entfaltet halten. Die Entfaltung könnte von anderen Chaperonen übernommen werden, deren Beteiligung am Abbau bisher noch nicht erkannt wurde. Dieses Modell würde mit der Rolle der Hsp70 Chaperone bei der Proteinfaltung übereinstimmen. Bei der Proteinfaltung verhindern sie Aggregationsbildungen durch Binden an hydrophobe Bereiche in ungefalteten Proteinen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

Chaperone der Hsp70–Familie arbeiten im Komplex mit Co-Chaperonen der DnaJ-Familie. Diese sind für die Substratspezifität der Hsp70 Chaperone verantwortlich (Misselwitz et al., 1998; Rudiger et al., 2001). Das mit den Proteinen der Ssa-Familie interagierende Co-Chaperon Ydj1p ist auch in den Abbau von zytosolischen Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-Sy-

stem involviert (Becker et al., 1996; Lee et al., 1996). Außerdem ist bekannt, dass die Chaperone der Ssa-Familie mit dem Proteasom interagieren (Verma et al., 2000). Der Abbau von CTG* ist in einem temperatursensitiven Ydj1p Mutant jedoch nicht verzögert (Abbildung 13 C). Deshalb wurden weitere DnaJ-Proteine auf ihre Beteiligung am CTG* Abbau hin untersucht. Gefunden wurde, dass in drei DnaJ-Protein Mutantenstämmen der Abbau von CTG* leicht verzögert wird (Abbildung 13 A). In den untersuchten DnaJ-Doppelmutantenstämmen ist der Phänotyp jedoch nicht verstärkt (Abbildung 13 B); es ist also anzunehmen, dass die drei DnaJ-Proteine überlappende Funktionen beim Abbau von CTG* haben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass noch weitere DnaJ-Proteine am Abbau von CTG* beteiligt sind, die aber als Einzelmutanten die Abbaukinetik von CTG* nicht beeinflussen. Ein Kandidat wäre z. B. Yfr041p, ein Protein, dessen Regulation der UPR unterliegt und dessen Expression durch ungefaltete Proteine im ER stark erhöht wird.

Die Proteine der AAA-ATPase-Familie sind universell einsetzbare Motormodule, die in verschiedenen Komplexen agieren können und unter anderem zum Auflösen von Proteinkomplexen eingesetzt werden (Neuwald et al., 1999; Vale, 2000). Cdc48p ist ein Mitglied dieser Familie, es gehört in eine Unterklasse, die zwei ATPase Module enthält. Cdc48p interagiert mit zwei weiteren Proteinen, Ufd1p und Npl4p (Hitchcock et al., 2001; Meyer et al., 2000; Rape et al., 2001). Dieser Komplex wird beim Abbau bzw. der Prozessierung von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System benötigt (Ghislain et al., 1996; Hitchcock et al., 2001; Hoppe et al., 2000; Johnson et al., 1995; Koegl et al., 1999; Rape et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass der Komplex selektiv an ubiquitinierte Proteine binden kann (Dai und Li, 2001; Rape et al., 2001), mit dem Proteasom assoziiert ist (Verma et al., 2000) und an die zytosolische Seite der ER Membran bindet (Meyer et al., 2000). Nachdem die hier dargestellten Untersuchungen beendet waren, erschienen weitere Veröffentlichungen die den Einfluss des Komplexes aus Cdc48p, Ufd1p und Npl4p auf den Abbau von ungefalteten Proteinen aus dem ER beschreiben (Bays et al., 2001b; Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2001; Braun et al., 2002). Dies und die Versuche zum Abbau von CPY*, CT* und CTG* zeigen, dass der Komplex wahrscheinlich allgemein in den Abbau von missgefalteten Proteinen aus dem ER involviert ist.

E. Jarosch konnte durch weitere Versuche die Wirkungsweise des Cdc48p-Ufd1p-Npl4p Komplexes näher charakterisieren. Da polyubiquitinierte CPY* in Proteasomenmutanten teilweise löslich im Zytosol vorliegt, kann das Proteasom beim Transport der Substrate ins Zytosol nicht beteiligt sein. In Ufd1p Mutanten verbleibt die polyubiquitinierte CPY* hingegen an der Außenseite der ER-Membran. Dies zeigt, dass der Komplex aus Cdc48p, Ufd1p und Npl4p polyubiquitinierte CPY* von der zytosolischen Seite der ER-Membran ablöst und dem Proteasom zugänglich macht. Für den Transport von CPY* ins Zytosol ist die Polyubiquitinierung wichtig. Wird diese durch das Fehlen von Ubc1p und Ubc7p gestört, so findet man CPY* Spezies mit kürzeren Ubiquitinketten, die sich zudem teilweise im ER Lumen befinden. Polyubiquitinierung wirkt somit als Sperre beim Export aus dem ER und verhindert das „Zurückrutschen“ des Substrates ins ER (Jarosch et al., 2002).

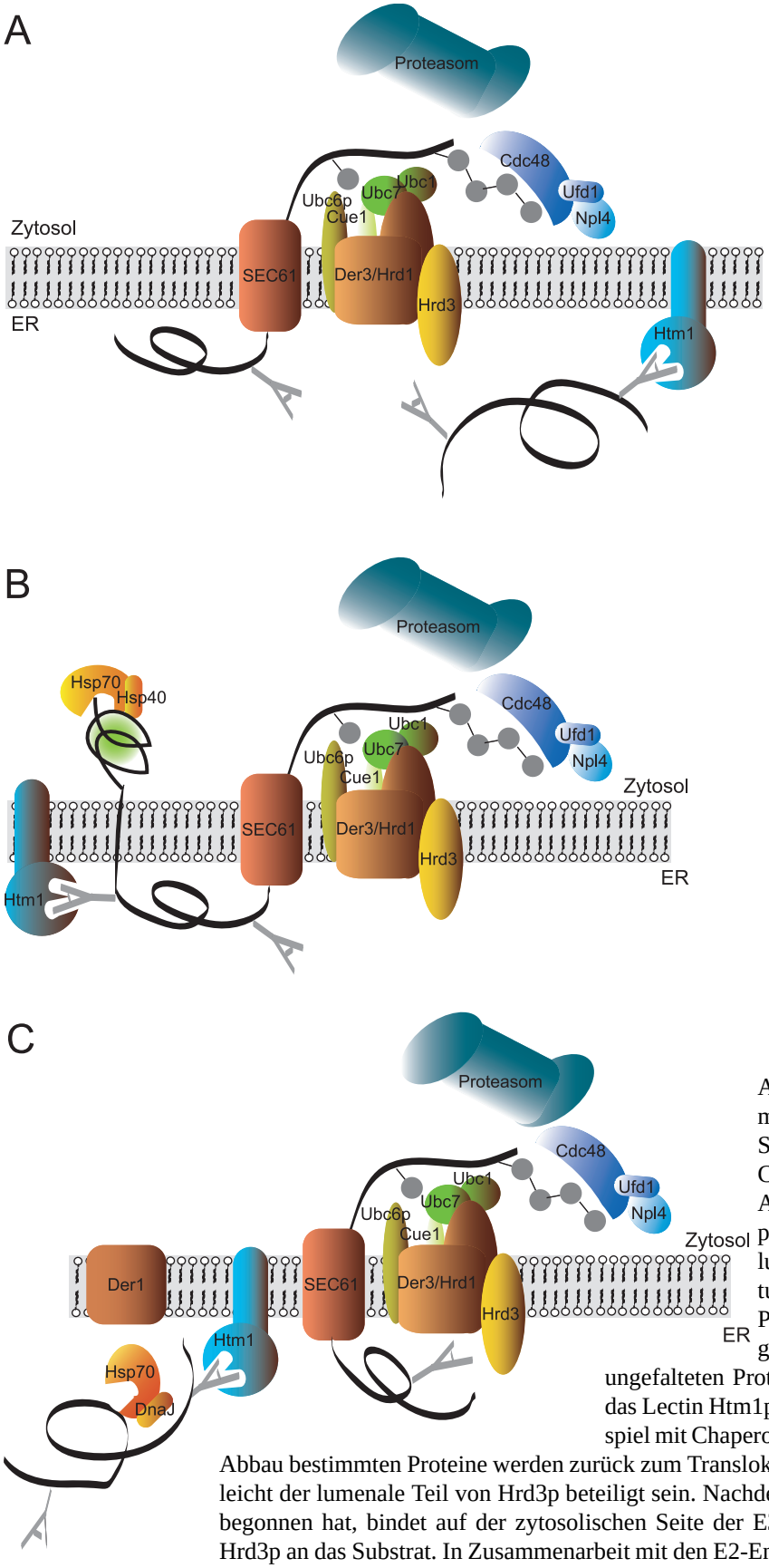


Abbildung 33: ERAD-Abbaumechanismus für glykosylierte Substrate wie CPY*, CT* und CTG*. A) Grundmaschinerie zum Abbau von missgefalteten Glykoproteinen mit Defekten im luminalen Teil. Die Zeit für die Faltung eines Proteins wird durch die Prozessierung der Zuckerreste vorgegeben. Die Erkennung des ungefalteten Proteins erfolgt wahrscheinlich über das Lectin Htm1p, möglicherweise im Zusammenspiel mit Chaperonen aus dem ER Lumen. Die zum Abbau bestimmten Proteine werden zurück zum Translokon gebracht. Hierbei könnte vielleicht der lumenale Teil von Hrd3p beteiligt sein. Nachdem der Rücktransport ins Zytosol begonnen hat, bindet auf der zytosolischen Seite der E3-Komplex aus Der3/Hrd1p und Hrd3p an das Substrat. In Zusammenarbeit mit den E2-Enzymen Ubc1p und Ubc7p erfolgt die Polyubiquitinierung des Substrates. Dies und der Komplex aus Cdc48p/Ufd1p/Npl4p bewirken den Transport ins Zytosol. Dort erfolgt der Abbau durch das Proteasom. B) Transmembranproteine mit zytosolischer Domäne erfordern zum Abbau zusätzlich zytosolische Chaperone der Hsp70- und Hsp40- Familien. Diese sind vielleicht zur Entfaltung der zytosolischen Domäne notwendig. C) Lösliche Substrate brauchen luminale Chaperone der Hsp70-und Hsp40- Familien. Diese werden gebraucht, um das Substrat in einem löslichen Zustand zu halten. Zusätzlich ist noch das Membranprotein Der1p für den Abbau nötig.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass für den Abbau der verschiedenen missgefalteten Modellsubstrate eine Grundmaschinerie existiert; Veränderungen des Substrates führen zu einer Veränderung der Abbaumaschinerie. Der Abbaumechanismus scheint flexibel modulierbar zu sein, ohne dass sich das Grundgerüst an Komponenten verändert. Dies wirft die interessante Frage auf, wie die zusätzlichen Komponenten mit der Abbaumaschinerie verbunden sind, durch direkte Interaktion oder indirekt, nur über Interaktion mit dem missgefalteten Substrat. Ein Modell, das den Abbau von CPY*, CT* und CTG* vergleichend darstellt, bietet Abbildung 33.

Einfluss des sekretorischen Transports auf ERAD

Das sekretorische System und ERAD sind in Teilen miteinander verknüpft. ERAD kann nur dann effektiv ablaufen, wenn der Transport durch das sekretorische System störungsfrei verläuft. Mutanten, die den Transport zwischen ER und Golgi stören, wie z. B. *ufe1-1*, *sec12-1*, *sec23-1*, *sec18-1* und *sed5-1* beeinflussen auch den Abbau von CPY* nachteilig (Abbildung 18 A und B). Vor kurzer Zeit erschienen weitere Veröffentlichungen, die über gleiche Beobachtungen berichteten (Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001). Diese Autoren geben zwei mögliche Interpretationen ihrer Daten an: 1) lösliche Substrate, die von der Qualitätskontrolle erkannt werden, könnten zum Golgi und danach zurück zum ER transportiert werden, entweder um eine Modifikation zu erhalten die den Abbau beschleunigt (Caldwell et al., 2001) oder weil diese Route der vorgesehene Weg zum Abbau ist (Vashist et al., 2001). 2) Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ein bisher unbekannter Faktor zwischen ER und Golgi hin und her transportiert wird, im Golgi modifiziert werden muss und der für den Abbau von löslichen Substraten benötigt wird. Das Substrat bleibt bei diesem Modell im ER zurück (Caldwell et al., 2001).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse führen zu einer anderen Interpretation: in den Mutantenstämmen *ufe1-1*, *sec12-1*, *sec23-1*, *sec18-1* und *sed5-1* ist der Transport zwischen dem ER und Golgi vollständig oder fast vollständig unterbunden, dies kann durch Fehlen der p2 Form von CPY (Stevens et al., 1982) oder durch den Maturierungsdefekt von PrA (Abbildung 18 C und D) gezeigt werden. Trotzdem ist der Abbau von CPY* in den Mutantenstämmen höchst unterschiedlich, vor allem die Unterschiede zwischen *sec12-1* und *sec18-1* sowie *sec23-1*, *sed5-1* und *ufe1-1* Zellen sind offensichtlich. In den Zellen mit *sec12-1*, *sec23-1* und *sed5-1* Mutationen werden noch beträchtliche Mengen an CPY* abgebaut, obwohl der Transportdefekt vergleichbar oder noch ausgeprägter ist als in den *sec18-1* und *ufe1-1* Mutantenstämmen. Schaltet man in den *sec12-1* Zellen noch zusätzlich Sed4p aus, ein mit Sec12p eng verwandtes Protein, wird die Abbaukinetik von CPY* nicht verändert. Weitere Homologe zu Sec12p, die dessen Funktion übernehmen könnten, sind in Hefe bisher nicht bekannt. Mit diesen Ergebnissen ist es schwer vorstellbar, wie in einigen der Mutantenstämme CPY* in den Golgi gelangen könnte, um eine Modifikation zu erhalten oder warum der vorgesehene Abbauweg in einigen der Mutantenstämme geändert werden sollte und in anderen nicht.

Darüber hinaus müsste es nach den oben genannten Modellen bei Blockade des Transportes vom Golgi zum ER durch Ausschalten der COPI Vesikel Bildung zu ähnlichen Defekten im Abbau von CPY* kommen wie in den Mutanten der COPII-Vesikel Bildung. Dies ist jedoch nicht der Fall. Defekte in den COPI Untereinheiten Sec21p und Sec27p führen zu keiner dramatischen Verlängerung der Halbwertszeit von CPY* (Abbildung 22). Der in *sec27-1* Zellen beobachtete Abbau findet auch nicht in der Vakuole statt (Abbildung 22 B). Zusammengenommen lassen sich die Transportdefekte in den einzelnen Transportmutanten nicht mit den Abbaudefekten von CPY* in Einklang bringen. Die oben genannten Modelle (Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001) passen nicht zufrieden stellend zu den hier präsentierten experimentellen Befunden. Nur wenn es einen COPI-Vesikel unabhängigen Rücktransport vom Golgi zum ER gäbe, wären diese Modelle möglich.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die experimentellen Befunde ist, dass in den verwendeten Mutantenstämmen die gestörte Struktur des ER den Abbau von CPY* behindert. Es ist bekannt, dass in *ufe1-1* oder *sec23-1* Zellen bei 37°C die Menge an peripherem ER erheblich reduziert und disorganisiert ist (Prinz et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Misslokalisation von Kar2p, die in den Transportmutantenstämmen beobachtet wurde (Nishikawa et al., 1994), eine Rolle spielt. Kar2p ist für den Abbau von CPY* notwendig (Plemper et al., 1997), nicht jedoch für den Abbau von missgefalteten Membranproteinen (Abbildung 9; Kiser et al., 2001; Plemper et al., 1998; Zhang et al., 2001). Dies würde auch erklären, warum falsch gefaltete Membranproteine in *sec12-4* oder *sec18-1* Mutanten normal abgebaut werden (Biederer et al., 1996; Katzmann et al., 1999; Vashist et al., 2001), während der Abbau von CPY* defekt ist. Dies deutet darauf hin, dass die gestörte Morphologie des ER und/oder die Misslokalisation von Kar2p die Veränderungen im Abbau von CPY* hervorrufen. In diesem Sinne lassen sich auch die starken Defekte im Abbau von CPY* in *Δire1 sec23-1* bzw. *ufe1-1* Doppelmutanten erklären. Das ER ist verkleinert, Chaperone wie Kar2p sind misslokalisiert und den Zellen wurde die Möglichkeit genommen, Proteine verstärkt zu exprimieren, die für die Bekämpfung ungefalteter Proteine im ER notwendig sind. Das Ergebnis ist ein praktisch vollständiges Erliegen des CPY* Abbaus.

Die leichte Beschleunigung des CPY* Abbaus in *ufe1-1* Zellen bei Überexpression von Sec18p deutet darauf hin, dass die Beteiligung von Ufe1p am vesikulären Transport für den Defekt im CPY* Abbau verantwortlich ist und nicht die homotypische Fusion von ER Membranen, die zusammen mit Cdc48p ausgeübt wird (Abbildung 20). Cdc48p ist jedoch auch am Abbau von CPY* beteiligt, zusammen mit seinen Komplexpartnern Ufd1p und Npl4p. Dieser Komplex ist wahrscheinlich beim Export aus dem ER bzw. dem Ablösen der missgefalteten Proteine von der ER Membran beteiligt (Bays et al., 2001b; Jarosch et al., 2002; Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2001; Braun et al., 2002).

Des Weiteren könnten die Defekte beim Abbau von CPY* in ER-Golgi Transportmutanten auch auf ein neues Kompartiment hindeuten, von dem aus der Abbau von CPY* stattfindet und das durch vesikulären Transport erreichbar ist. Solch ein spezielles ERAD-Kompartiment wurde vor kurzem in Säugerzellen beschrieben (Kamhi-Nesher et al., 2001). Die Lokalisierung von CPY*-HA durch Elektronenmikroskopie in Wildtyp oder *Δder1* Zellen deutet jedoch nicht auf die Existenz eines solchen Kompartiments in Hefe hin. Die schlüssigste Interpretation der experimentellen Daten ist, dass der Abbaudefekt von CPY* in den ER-Golgi Transportmutanten auf indirekten Einflüssen beruht und dass keine Vesikeltransportschritte in den Abbaumechanismus von CPY* involviert sind.

Einfluss von ERAD auf das sekretorische System

Wenn der Abbau von ungefalteten Proteinen gestört ist, hat dies auch Auswirkungen auf die Morphologie der Organellen des sekretorischen Systems. In *Δder1*, *Δder3/hrd1* und *Δhrd3* Zellen ist das ER vergrößert (Abbildung 26), dies ist noch verstärkt, wenn ein missgefaltetes Membranprotein exprimiert wird (Abbildung 27). Die Proliferation des ER ist wahrscheinlich auf die Aktivierung des UPR in diesen Zellen zurück zuführen, da *Δder1 Δire1* Doppelmutanten keine solchen Veränderungen zeigen (Abbildung 28).

Eine weitere Veränderung betrifft den Golgi Apparat. In den ERAD defizienten Zellen treten vermehrt gestapelte Golgi Zisternen auf; die Morphologie ähnelt stark der aus höheren Eukaryonten (Abbildung 29). Das Auftreten könnte auf leichte Defekte im Transport durch den Golgi hindeuten, da ähnliche morphologische Veränderungen auch in *sec7-1* Mutanten unter Bedingungen auftreten, bei denen der Intra-Golgi Transport blockiert ist (Rambourg et al., 1993). In *Δder1* Zellen findet sich CPY*-HA nicht nur im ER, sondern auch im Golgi, in der Vakuole und außerhalb der Zelle. Wenn der Abbau von löslichen, ungefalteten Proteinen blockiert ist, entkommen diese der Qualitätskontrolle im ER und gelangen zum Abbau in die Vakuole oder werden sezerniert (Abbildungen 23 C, D, 24 und 25).

In *Δder1* Zellen wird CPY langsamer zur Vakuole transportiert als in Wildtypzellen, wenn gleichzeitig CPY*-HA exprimiert wird (Abbildung 31). Dies zeigt, dass missgefaltete Proteine im sekretorischen System auch eine Auswirkung auf den Transport durch das sekretorische System haben. Es könnte sich um eine direkte Störung des Transports durch die ungefalteten Proteine handeln, z.B. durch Kompetition um den Sortierungsrezeptor Vps10p (Stack et al., 1995) oder eine Beeinflussung der vakuolären Funktion. Überaschenderweise ist der Transport aus dem ER von CPY nicht gestört, da er mit oder ohne zusätzliche Expression von CPY*-HA gleich schnell verläuft (Abbildung 31 und Daten nicht gezeigt). Die Defekte im CPY-Transport durch den sekretorischen Weg bei zusätzlicher Expression von CPY*-HA können nicht einfach durch ein Überladen des sekretorischen Systems erklärt werden. Wenn man das sekretorische System gezielt durch Expression von zusätzlicher CPY überlädt, führt dies zu einer starken Verlangsamung des gesamten Transportprozesses in Wildtyp und *Δder1* Zellen. Schon die Halb-

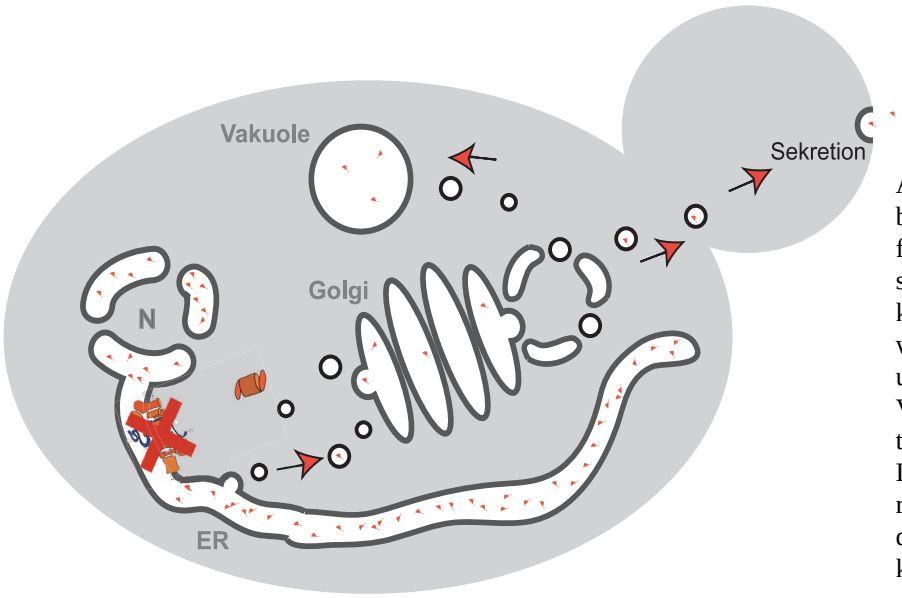


Abbildung 34: Defekte im Abbau von CPY* führen zu Defekten im sekretorischen System. Wenn CPY* im ER akkumuliert, entkommt es teilweise dem Rückhaltesystem und wird über den Golgi zur Vakuole oder aus der Zelle transportiert. Dies führt zu Defekten im Transport von richtig gefalteten Proteinen durch den Golgi oder zur Vakuole.

wertszeit für den Export aus dem ER ist ungefähr verdoppelt (Abbildung 32), während dieser Transportschritt bei der zusätzlichen Expression von CPY*-HA nicht beeinflusst wird (Abbildung 31).

Abbildung 34 verdeutlicht die Auswirkungen der ERAD Probleme in *der*-Mutanten auf das sekretorische System: durch die Akkumulation von CPY* im ER ist das Rückhaltesystem überlastet. CPY* entkommt teilweise in den Golgi, die Vakuole und wird darüber hinaus ins umgebende Medium sezerniert. Die ungefalteten Proteine verursachen in diesen Organellen Probleme. Darüberhinaus proliferiert das ER und die Morphologie des Golgi Apparates ändert sich.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Abbau von löslichen, missgefalteten Proteinen nur bei normal funktionierendem ER-Golgi Transport abläuft und umgekehrt, dass Sekretion nur reibungslos verläuft, wenn der Abbau von ungefalteten Proteinen aus dem ER ungestört ist.

Ausblick

Mit den Untersuchungen zum Abbau von CPY*, CT* und CTG* konnte gezeigt werden, dass zentrale Teile der Abbaumaschinerie für diese missgefalteten Modellproteine gleich sind. Es hat sich aber auch gezeigt, dass je nach Topologie des Abbausubstrats weitere Komponenten für den Abbau hinzugezogen werden. Eine weitere Aufklärung dieser Komponenten bzw. ihrer genauen Funktion wird helfen, den Abbaumechanismus besser zu verstehen.

Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen ist sicher das zur Polyubiquitinierung benötigte E3, Der3/Hrd1p. CPY* wird in *Δder3/hrd1* Mutanten wesentlich stärker stabilisiert als CT* und CTG*. Es könnte sein, dass ein weiteres E3, wie z. B. Ssm4/Doa10p, die Aufgabe von Der3/Hrd1p teilweise übernimmt, oder dass CT* und CTG*, bei Blockade des proteasomalen Abbaus, zur Vakuole gelangen können. Zur Klärung können Doppelmutanten wie *Δder3/hrd1*

Δssm4/doa10 und *Δder3/hrd1 Δpep4* verwendet werden. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob die DnaJ-Proteine Ygl128p, Hdj1p und Ypr61p mit den Chaperonen der Ssa-Familie interagieren und zusammen die Entfaltung der GFP-Domäne in CTG* bewirken. Auch der Zeitpunkt der Entfaltung der zytosolischen GFP-Domäne ist ungeklärt; findet die Entfaltung durch ein Signal aus dem ER-Lumen statt oder erst nach dem Transport des Substrates zum Proteasom, also nach der Polyubiquitinierung? Im letzteren Fall müsste es möglich sein, zytosolische Intermediate in Ssa-Mutanten zu finden. Interessanterweise tritt kein Zwischenprodukt in diesen Mutanten auf, CTG* akkumuliert in voller Länge. Zur Klärung, ob die DnaJ-Proteine überlappende Funktionen aufweisen oder nur gemeinsam volle Funktionalität besitzen, könnte der Abbau von CTG* bei Überexpression eines der DnaJ-Proteine in Nullmutanten der anderen getestet werden. Im ersteren Fall sollte sich der Abbau von CTG* beschleunigen, im Letzteren nicht.

Zur Frage, ob das sekretorische System generell durch missgefaltete Proteine gestört wird, könnte durch Messung des Transports von anderen Proteinen des sekretorischen Systems wie Invertase, Proteinase yscB oder Carboxypeptidase yscS in *Δder1* Mutanten Aufschluss geben.

Eine offene Frage ist auch, was die Zurückhaltung von CPY*, CT* und CTG* im ER bewirkt. Ob sie durch ein spezielles Protein oder durch Interaktion mit mehreren Proteinen wie dem Lektin Htm1p oder Chaperonen wie Kar2p oder PDI zurückgehalten werden, könnte durch Messung der Sekretion von CPY*, CT* und CTG* in entsprechenden Mutantenstämmen untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Aalto, M. K., Jantti, J., Ostling, J., Keranen, S., und Ronne, H. (1997). Mso1p: a yeast protein that functions in secretion and interacts physically and genetically with Sec1p, Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 7331-7336.

Ausubel, F. M. e. a. (1992). Current Protocols in molecular Biology (New York, Greene).

Banfield, D. K., Lewis, M. J., und Pelham, H. R. (1995). A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex, Nature *375*, 806-809.

Bays, N. W., Gardner, R. G., Seelig, L. P., Joazeiro, C. A., und Hampton, R. Y. (2001a). Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER- associated degradation, Nat Cell Biol *3*, 24-29.

Bays, N. W., Wilhovsky, S. K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K., und Hampton, R. Y. (2001b). HRD4/NPL4 Is Required for the Proteasomal Processing of Ubiquitinated ER Proteins, Mol Biol Cell *12*, 4114-4128.

Bebok, 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*, 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*, 4378-4386.

Belden, W. J., und Barlowe, C. (2001). Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response, Mol Biol Cell *12*, 957-969.

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*, 2069-2076.

Biederer, T., Volkwein, C., und Sommer, T. (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface [see comments], Science *278*, 1806-1809.

Blatch, G. L., und Lassle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein- protein interactions, Bioessays *21*, 932-939.

Bonifacino, J. S., und Weissman, A. M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways, Annu Rev Cell Dev Biol *14*, 19-57.

Bordallo, J., Plemper, R. K., Finger, A., und Wolf, D. H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded lumenal and integral membrane proteins, Mol Biol Cell *9*, 209-222.

Braakman, I. (2001). A novel lectin in the secretory pathway: An elegant mechanism for glycoprotein elimination, EMBO Rep *2*, 666-668.

Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., und Jentsch, S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4)chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. Embo J *21*, 615-21.

Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goeckeler, J. L., Kruse, K. B., und McCracken, A. A. (1999). The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct, J Biol Chem *274*, 3453-3460.

Caldwell, S. R., Hill, K. J., und Cooper, A. A. (2001). Degradation of Endoplasmic Reticulum (ER) Quality Control Substrates Requires Transport between the ER and Golgi, J Biol Chem *276*, 23296-23303.

Campbell, J. L., und Schekman, R. (1997). Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum- derived COPII vesicles, Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 837-842.

Cao, X., Ballew, N., und Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins, Embo J *17*, 2156-2165.

Casagrande, R., Stern, P., Diehn, M., Shamu, C., Osario, M., Zuniga, M., Brown, P. O., und Ploegh, H. (2000). Degradation of proteins from the ER of S. cerevisiae requires an intact unfolded protein response pathway, Mol Cell *5*, 729-735.

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*, 137-142.

Chapman, R., Sidrauski, C., und Walter, P. (1998). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus, Annu Rev Cell Dev Biol *14*, 459-485.

Chevet, E., Cameron, P. H., Pelletier, M. F., Thomas, D. Y., und Bergeron, J. J. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation, Curr Opin Struct Biol *11*, 120-124.

Chiang, H. L., und Schekman, R. (1991). Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole, Nature *350*, 313-318.

Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., und Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors, Gene *110*, 119-122.

Dai, R. M., und Li, C. C. (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. Nat Cell Biol *3*, 740-4.

Deak, P. M. (2001) Proteinqualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums: die zentrale Funktion der Ubiquitin-Protein-Ligase Der3/Hrd1p, Dissertation, Stuttgart.

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*, 10663-10669.

Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B., und Schekman, R. (1994). Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic, J Biol Chem *269*, 24486-24495.

Dürr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H., und Rudolph, H. K. (1998). The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca2+ and Mn2+ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation, Mol Biol Cell *9*, 1149-1162.

Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R., und Kuchler, K. (1995). Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in Saccharomyces cerevisiae, Mol Cell Biol *15*, 5879-5887.

Ellgaard, L., Molinari, M., und Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway, Science *286*, 1882-1888.

Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L., und Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole, J Bacteriol *183*, 5942-5955.

Fewell, S. W., Travers, K. J., Weissman, J. S., und Brodsky, J. L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. Annu Rev Genet *35*, 149-91.

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*, 565-574.

Finley, D. (2001). Signal transduction. An alternative to destruction, Nature *412*, 283, 285-286.

Friedländer, 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*, 379-384.

Fröhlich, K. U., Fries, H. W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., und Mecke, D. (1991). Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression, J Cell Biol *114*, 443-453.

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*, 69-82.

Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F., und Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin- mediated proteolysis in Saccharomyces cerevisiae, Embo J *15*, 4884-4899.

Gimeno, R. E., Espenshade, P., und Kaiser, C. A. (1995). SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation, J Cell Biol *131*, 325-338.

Glick, B. S. (2000). Organization of the golgi apparatus, Curr Opin Cell Biol *12*, 450-456.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Larsen, C. N., Schmidt, M., und Finley, D. (2000). The Regulatory Particle of the Yeast Proteasome. In Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis, W. Hilt, and D. H. Wolf, eds. (Eurekah.com), pp. 71-90.

Graham, T. R., und Emr, S. D. (1991). Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant, J Cell Biol *114*, 207-218.

Griffiths, G. (1993). Labeling reactions for immunocytochemistry. In Fine structure immunocytochemistry, G. Griffiths, ed. (Berlin, Germany, Springer), pp. 237-275.

Guthrie, C. und Fink, G. R. (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular biology, Vol 194, Acad. Press).

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

Hardwick, K. G., und Pelham, H. R. (1992). SED5 encodes a 39-kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex, J Cell Biol *119*, 513-521.

Hartl, F. U., und Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein, Science *295*, 1852-1858.

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

Hershko, A., und Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system, Annu Rev Biochem *67*, 425-479.

Heinemeyer, W. (2000). Active Sites and Assembly of the 20S Proteasome. In Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis, W. Hilt, and D. H. Wolf, eds. (Eurekah.com), pp. 48-70.

Hill, K., und Cooper, A. A. (2000). Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system, Embo J *19*, 550-561.

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

Hitchcock, A. L., Krebber, H., Frietze, S., Lin, A., Latterich, M., und Silver, P. A. (2001). The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation, Mol Biol Cell *12*, 3226-3241.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., und Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing, Cell *102*, 577-586.

Horton, L. E., James, P., Craig, E. A., und Hensold, J. O. (2001). The yeast hsp70 homologue Ssa is required for translation and interacts with Sis1 and Pab1 on translating ribosomes, J Biol Chem *22*, 22.

Hosobuchi, M., Kreis, T., und Schekman, R. (1992). SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer, Nature *360*, 603-605.

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

Jakob, C. A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., und Aebi, M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast, EMBO Rep *2*, 423-430.

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

Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., und Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA- ATPase Cdc48, Nat Cell Biol *28*, 28.

Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L., und Riordan, J. R. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing, Cell *83*, 129-135.

Jiang, C., Fang, S. L., Xiao, Y. F., O'Connor, S. P., Nadler, S. G., Lee, D. W., Jefferson, D. M., Kaplan, J. M., Smith, A. E., und Cheng, S. H. (1998). Partial restoration of cAMP-stimulated CFTR chloride channel activity in DeltaF508 cells by deoxyspergualin, Am J Physiol *275*, C171-178.

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.

Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M., und Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal, J Biol Chem *270*, 17442-17456.

Johnson, J. L., und Craig, E. A. (2001). An Essential Role for the Substrate-binding Region of Hsp40s in Saccharomyces cerevisiae, J Cell Biol *152*, 851-856.

Kaiser, C. A., und Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway, Cell *61*, 723-733.

Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S. V., Ehrlich, R., und Lederkremer, G. Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum, Mol Biol Cell *12*, 1711-1723.

Kärgel, E., Menzel, R., Honeck, H., Vogel, F., Bohmer, A., und Schunck, W. H. (1996). Candida maltosa NADPH-cytochrome P450 reductase: cloning of a full- length cDNA, heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae and function of the N-terminal region for membrane anchoring and proliferation of the endoplasmic reticulum, Yeast *12*, 333-348.

Katzmann, D. J., Epping, E. A., und Moye-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*, 2998-3009.

Kelley, W. L. (1999). Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s, Curr Biol *9*, R305-308.

Kiser, G. L., Gentzsch, M., Kloser, A. K., Balzi, E., Wolf, D. H., Goffeau, A., und Riordan, J. R. (2001). Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in Saccharomyces cerevisiae, Arch Biochem Biophys *390*, 195-205.

Klionsky, D. J., und Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm, Annu Rev Cell Dev Biol *15*, 1-32.

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*, 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*, 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*, 990-996.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., und Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly, Cell *96*, 635-644.

Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P., und Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion, Nature *388*, 75-78.

Kopito, R. R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection, Cell *88*, 427-430.

Kostova, Z., und Wolf, D. H. (2002). Protein Quality Control in the Export Pathway: The Endoplasmic Retikulum and its Cytoplasmic Proteasome Connection. In Protein Targeting, Transport and Translocation, R. E. Dalbey, and G. von Heijne, eds. (London-New York, Academic Press), pp. 180-213.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature *227*, 680-685.

Latterich, M., Fröhlich, K. U., und Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes, Cell *82*, 885-893.

Lee, D. H., Sherman, M. Y., und Goldberg, A. L. (1996). Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in Saccharomyces cerevisiae, Mol Cell Biol *16*, 4773-4781.

Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., und Cosson, P. (1994). Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum, Cell *79*, 1199-1207.

Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C., und Cosson, P. (1995). Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E, J Cell Biol *129*, 971-978.

Lewis, M. J., und Pelham, H. R. (1996). SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum, Cell *85*, 205-215.

Lewis, M. J., Rayner, J. C., und Pelham, H. R. (1997). A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum, Embo J *16*, 3017-3024.

Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., und Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae, Yeast *14*, 953-961.

Ma, J., und Lindquist, S. (2001). Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation, Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 14955-14960.

Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., und Fröhlich, K. U. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p, Mol Biol Cell *9*, 131-141.

Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., und Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane, Cell *97*, 553-564.

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*, 100-105.

Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D., und Warren, G. (2000). A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways, Embo J *19*, 2181-2192.

Misselwitz, B., Staeck, O., und Rapoport, T. A. (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences, Mol Cell *2*, 593-603.

Mizuta, K., und Warner, J. R. (1994). Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis, Mol Cell Biol *14*, 2493-2502.

Morin-Ganet, M. N., Rambourg, A., Deitz, S. B., Franzusoff, A., und Kepes, F. (2000). Morphogenesis and dynamics of the yeast Golgi apparatus, Traffic *1*, 56-68.

Nakatsukasa, K., Nishikawa Si, S., Hosokawa, N., Nagata, K., und Endo, T. (2001). Mnl1p, an alpha -Mannosidase-like Protein in Yeast Saccharomyces cerevisiae, Is Required for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Glycoproteins, J Biol Chem *276*, 8635-8638.

Nathan, D. F., und Lindquist, S. (1995). Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase, Mol Cell Biol *15*, 3917-3925.

Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., und Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, Genome Res *9*, 27-43.

Ng, D. T., Spear, E. D., und Walter, P. (2000). The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control, J Cell Biol *150*, 77-88.

Nishikawa, S., Hirata, A., und Nakano, A. (1994). Inhibition of endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport induces relocalization of binding protein (BiP) within the ER to form the BiP bodies. Mol Biol Cell *5*, 1129-1143.

Nishikawa, S., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L., und Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation, J Cell Biol *153*, 1061-1070.

Novick, P., und Schekman, R. (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature- sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae, Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 1858-1862.

Odorizzi, G., Babst, M., und Emr, S. D. (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body, Cell *95*, 847-858.

Patel, S. K., Indig, F. E., Olivieri, N., Levine, N. D., und Latterich, M. (1998). Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion, Cell *92*, 611-620.

Perlmutter, D. H. (1996). Alpha-1-antitrypsin deficiency: biochemistry and clinical manifestations, Ann Med *28*, 385-394.

Pilon, M., Schekman, R., und Romisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation, Embo J *16*, 4540-4548.

Plemper, 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*, 891-895.

Plemper, R. K., Egner, R., Kuchler, K., und Wolf, D. H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome, J Biol Chem *273*, 32848-32856.

Plemper, 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*, 4123-4134.

Plemper, 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*, 241-245.

Plemper, R. K., und Wolf, D. H. (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease, Trends Biochem Sci *24*, 266-270.

Ponting, C. P. (2000). Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction, Biochem J *351 Pt 2*, 527-535.

Prinz, W. A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J. A., Silver, P. A., und Rapoport, T. A. (2000). Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae, J Cell Biol *150*, 461-474.

Rabinovich, E., Kerem, A., Fröhlich, K. U., Diamant, N., und Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation, Mol Cell Biol *22*, 626-634.

Rambourg, A., Clermont, Y., und Kepes, F. (1993). Modulation of the Golgi apparatus in Saccharomyces cerevisiae sec7 mutants as seen by three-dimensional electron microscopy, Anat Rec *237*, 441-452.

Rambourg, A., Clermont, Y., Ovtracht, L., und Kepes, F. (1995). Three-dimensional structure of tubular networks, presumably Golgi in nature, in various yeast strains: a comparative study, Anat Rec *243*, 283-293.

Rambourg, A., Jackson, C. L., und Clermont, Y. (2001). Three dimensional configuration of the secretory pathway and segregation of secretion granules in the yeast Saccharomyces cerevisiae, J Cell Sci *114*, 2231-2239.

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., und Jentsch, S. (2001). Mobilization of Processed, Membrane-Tethered SPT23 Transcription Factor by CDC48(UFD1/NPL4), a Ubiquitin-Selective Chaperone, Cell *107*, 667-677.

Rendueles, P. S., und Wolf, D. H. (1988). Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryote cell, FEMS Microbiol Rev *4*, 17-45.

Rose, M. D., Misra, L. M., und Vogel, J. P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene [published erratum appears in Cell 1989 Aug 25;58(4):following 801], Cell *57*, 1211-1221.

Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., und Bukau, B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone, Embo J *20*, 1042-1050.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Manniatis, T. (1989). Molecular Cloning-A Labatory Manual, 2. edn, Cold Spring Harbour Labatory Press).

Schekman, R., und Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding, Science *271*, 1526-1533.

Scherer, S., und Davis, R. W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro, Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 4951-4955.

Schröder, S., Schimmoller, F., Singer-Krüger, B., und Riezman, H. (1995). The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP, J Cell Biol *131*, 895-912.

Schröder-Köhne, S., Letourneur, F., und Riezman, H. (1998). Alpha-COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals in vitro and regulates access into retrograde transport, J Cell Sci *111*, 3459-3470.

Seufert, W., McGrath, J. P., und Jentsch, S. (1990). UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation, Embo J *9*, 4535-4541.

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*, 19-27.

Sommer, T., Jarosch, E., und Lenk, U. (2001). Compartment-specific functions of the ubiquitin-proteasome pathway, Rev Physiol Biochem Pharmacol *142*, 97-160.

Sommer, T., und Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum, Nature *365*, 176-179.

Sommer, T., und Wolf, D. H. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return, Faseb J *11*, 1227-1233.

Springer, S., und Schekman, R. (1998). Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs, Science *281*, 698-700.

Stack, J. H., Horazdovsky, B., und Emr, S. D. (1995). Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins, Annu Rev Cell Dev Biol *11*, 1-33.

Stevens, T., Esmon, B., und Schekman, R. (1982). Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole, Cell *30*, 439-448.

Stevens, T. L., Blum, J. H., Foy, S. P., Matsuuchi, L., und DeFranco, A. L. (1994). A mutation of the mu transmembrane that disrupts endoplasmic reticulum retention. Effects on association with accessory proteins and signal transduction, J Immunol *152*, 4397-4406.

Suzuki, T., Park, H., Hollingsworth, N. M., Sternglanz, R., und Lennarz, W. J. (2000). PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase, J Cell Biol *149*, 1039-1052.

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*, 2660-2674.

Teichert, U., Mechler, B., Muller, H., und Wolf, D. H. (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival, J Biol Chem *264*, 16037-16045.

Thumm, M. (2000). Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. Microsc Res Tech *51*, 563-72.

Tokuyasu, K. T. (1989). Use of poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinyl alcohol) for cryoultramicrotomy, Histochem J *21*, 163-171.

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*, 249-258.

Vale, R. D. (2000). AAA proteins. Lords Of the ring, J Cell Biol *150*, 13A-20.

Van Den Hazel, H. B., Kielland-Brandt, M. C., und Winther, J. R. (1996). Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases, Yeast *12*, 1-16.

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

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*, 3425-3439.

Walter, J., Urban, J., Volkwein, C., und Sommer, T. (2001). Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p, Embo J *20*, 3124-3131.

Walter, P., und Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. Annu Rev Cell Biol *10*, 87-119.

Wang, Q., und Chang, A. (1999). Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast, Embo J *18*, 5972-5982.

Ward, C. L., Omura, S., und Kopito, R. R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway, Cell *83*, 121-127.

Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., und Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction, Nature *384*, 432-438.

Wilhovsky, S., Gardner, R., und Hampton, R. (2000). HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation, Mol Biol Cell *11*, 1697-1708.

Yaffe, M. P., und Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast, Proc Natl Acad Sci U S A *81*, 4819-4823.

Ye, Y., Meyer, H. H., und Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol, Nature *414*, 652-656.

Zapun, A., Jakob, C. A., Thomas, D. Y., und Bergeron, J. J. (1999). Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum, Structure Fold Des *7*, R173-182.

Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M., und Freemont, P. S. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. Mol Cell *6*, 1473-84.

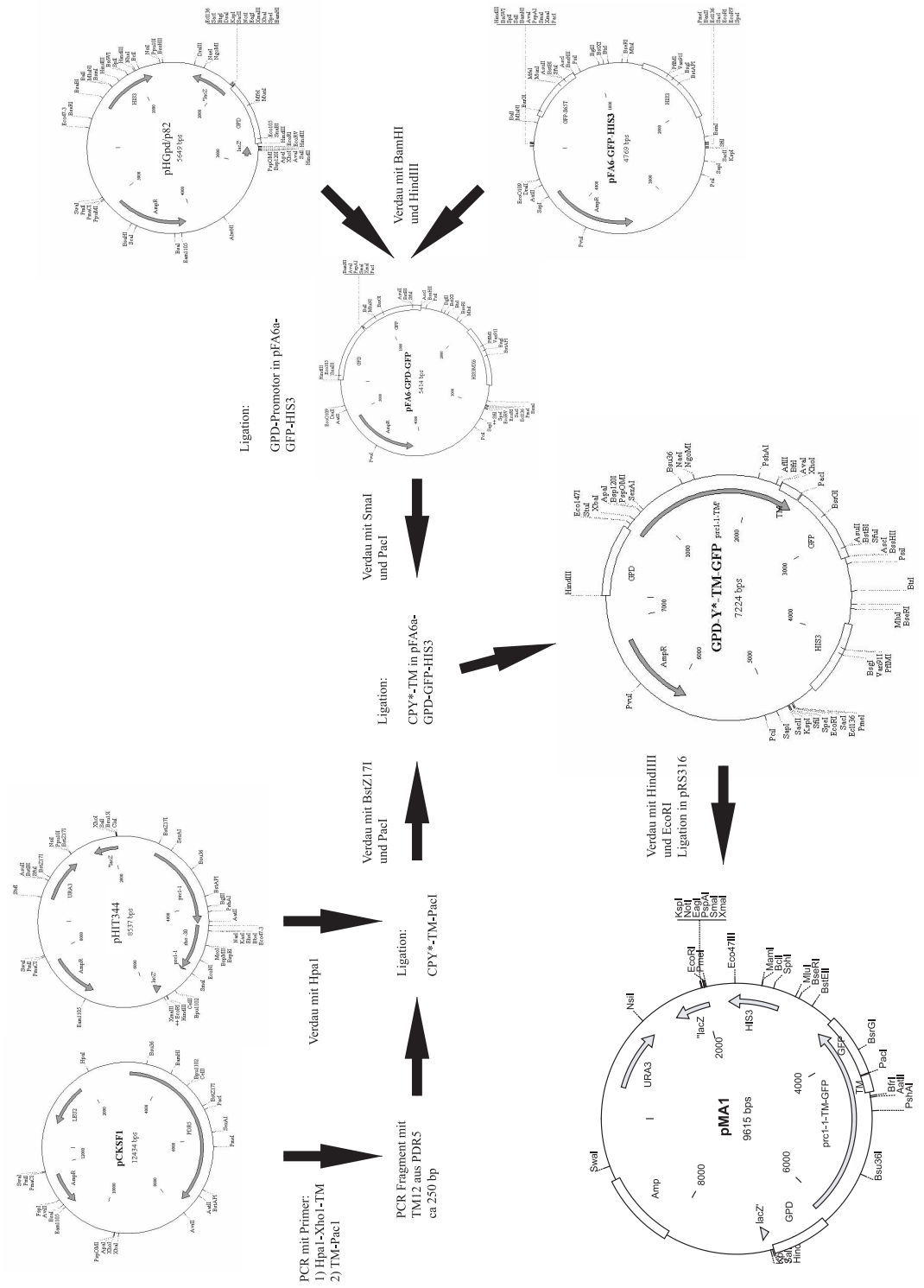
Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M. L., McCracken, A. A., Watkins, S. C., Michaelis, S., und Brodsky, J. L. (2001). Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast, Mol Biol Cell *12*, 1303-1314.

Zhou, M., und Schekman, R. (1999). The engagement of Sec61p in the ER dislocation process, Mol Cell *4*, 925-934.

Zimmer, T., Vogel, F., Ohta, A., Takagi, M., und Schunck, W. H. (1997). Protein quality—a determinant of the intracellular fate of membrane- bound cytochromes P450 in yeast, DNA Cell Biol *16*, 501-514.

Anhang

Klonierungsstrategie zum Erhalt des CTG* kodierenden Vektors pMA1



Veröffentlichungshinweise

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

Taxis, C., Bordallo, J. und Wolf, D.H., Cdc48p and Ufd1p are involved in ER degradation of CPY*. Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting, Seattle, 2000.

Taxis, C., Hitt, R., Deak, P. und Wolf, D.H., Different requirements for endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) of soluble and membrane bound malfolded carboxypeptidase Y (CPY*). CSHL Meeting-Yeast Cell Biology, Cold Spring Harbour Labatory, Cold Spring Harbor, 2001.

Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., und Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA- ATPase Cdc48. Nat Cell Biol *28*, 28.

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

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. D.H. Wolf für die Überlassung des Themas. Besonders bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung und die vielen interessanten Diskussionen in den vergangenen Jahren.

Herrn PD Dr. Hans Rudolph danke ich für die vielen Diskussionen und Hilfestellungen zur Bedienung der Apple Computer am Institut.

Bei Herrn Dr. Thomas Sommer bedanke ich mich vor allem für die gewährte Gastfreundschaft in Berlin. Für die freundliche Aufnahme von ihm und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich besonders.
Herrn Dr. Frank Vogel danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Sibylle Jäger, Jochen Strayle, Ulrike Epple und Karin Fiebig bin ich für die vielen Diskussionen und die nette Arbeitsatmosphäre dankbar.

Reiner Hitt bin ich für unzählige Tassen Kaffee, Tüten voller Kekse, Diskussionen ohne Ende und viel Spaß im Labor dankbar. Besonders erfreut hat mich, dass er immer, ohne zu murren, die Betätigung des Lichtschalters für mich übernommen hat.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.