

**Identifizierung neuer Faktoren, die am Abbau  
von humanem CFTR in Hefe beteiligt sind**

Von der Fakultät  
Geo - und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
**Andreas Gnann**  
aus Bensheim

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf  
Mitberichter: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2004

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart  
2004



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Zusammenfassung	7
Summary	8
<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
ABC-Transporter - eine weit verbreitete und wichtige Protein-familie	10
Mukoviszidose - Ursachen und Folgen einer unheilbaren Erbkrankheit	12
Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	14
Mukoviszidose in Hefe?	14
Prozessierung und Abbau im sekretorischen System	16
Qualitätskontrolle im ER	16
ER assoziierte Degradation (ERAD)	19
Medizinische Relevanz von ERAD	24
Aufgabenstellung	25
<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
Material	26
Hefestämme	26
Escherichia coli-Stämme	28
Plasmide	29
Primer	29
Antikörper	30
Kits	31
Enzyme	31
Chemikalien und Gebrauchsmaterial	32
Geräte	33
Methoden	35
Kultivierung der Modellorganismen	35
Bearbeitung der Modellorganismen	35
Hefe	35
Bakterien	39
Molekularbiologische Methoden	41
Biochemische Methoden	44

<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
Etablierung der Expression von humanem CFTR in Hefe	49
Einfluss des ER-Lektins Htm1p auf den Abbau von CFTR	54
Expression des HTM1-homologen Säuger-Lektins EDEM in Hefe und sein Einfluss auf den Abbau verschiedener Substrate in $\Delta$ htm1-Hefestämmen	56
$\alpha$ -1,2-Mannosidase I beeinflusst den Abbau von CFTR in Hefe nicht nachweisbar	59
Die Beteiligung von Ubiquitin-Ligasen (E3) am CFTR-Abbau	60
Der Cdc48-Proteinkomplex ist an der Extraktion der polytopen Transmembranproteine CFTR und Pdr5* $\rho$ aus der ER-Membran beteiligt	62
<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
Veröffentlichungshinweise und Förderungen	90
Danksagung	91
Erklärung	92

## Abkürzungen

AAA	„ATPase associated with a variety of cellular activities“
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Aq. bid.	Aqua bidestilata
AXI	Ampicillin-X-Gal-IPTG
β-ME	β-Mercapto-Ethanol
bp	Basenpaar
CDC	„cell division cycle“
cDNA	„complementary desoxy ribonucleic acid“
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
CHX	Cycloheximid
CIP	„calf intestinal alkaline phosphatase“
CM	„complete minimal dropout“-Medium
CPY	Carboxypeptidase Y
CPY*	mutierte Carboxypeptidase Y ( <i>prc1-1</i> / CPY <sup>G255R</sup> )
c <sub>s</sub>	Kälte-sensitiv
DER	„degradation in the ER“
DOA	„degradation of Alpha 2p“
DTT	Dithiothreitol
EDEM	„ER degradation enhancing α-mannosidase-like protein“
mEDEM	Maus EDEM
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	Epithel-Natrium-Kanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	„endoplasmic reticulum associated degradation“
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HRD	„HMG-CoA reductase degradation“
hHRD	humanes HRD
HRPO	Meerrettichperoxidase
HTM	„homologous to mannosidase I“
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilodalton
L	Liter

LB	Luria-Bertani Medium
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Mycrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mycroliter
MV	Mineralmedium
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDR5	„pleiotropic <u>d</u> rug <u>r</u> esistance number5“
PDR5*	mutiertes Pdr5p, auch pdr5-26 (Cys 1427 Tyr)
QC	Qualitätskontrolle
RD	Regulatorische Domäne
RING	„really <u>i</u> nteresting <u>n</u> ew <u>g</u> ene“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (25°C)
S	Sediment
SDS	Natriumodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
UBC	„ <u>u</u> biquitin <u>c</u> onjugating enzyme“
UFD	„ <u>u</u> biquitin <u>f</u> usion <u>d</u> egradation“
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
WT	Wildtyp
YPD	„yeast extract peptone <u>d</u> extrose“ (auch YEPD)

# Zusammenfassung

Mukoviszidose oder Cystische Fibrose (CF) ist die häufigste Erbkrankheit der weißen Erdbevölkerung. Ursache von CF sind Mutationen des ABC-Transporters *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), der primär als Chloridkanal in apikalen Epithelien verschiedener Gewebe fungiert. Die mit 70% häufigste Mutation ist die Deletion eines Phenylalanins an Position 508 ( $\Delta F508$ ) in der Nukleotidbindedomäne 1. Diese führt zu einer Fehlfaltung des Proteins, die von der zellulären Protein-Qualitätskontrolle (QC) erkannt und über die ER-assoziierte Degradation (ERAD) dem Ubiquitin-Proteasom-System zum Abbau zuführt wird. Die genaue Aufklärung dieser Mechanismen ist ein wesentlicher Punkt in der Mukoviszidose-Grundlagenforschung. Denn  $\Delta F508$ -CFTR ist trotz Fehlfaltung grundsätzlich funktionsfähig und könnte durch gezielte Beeinflussung dieser Mechanismen vor dem Abbau geschützt und in der Folge austransportiert werden.

Da die Prozesse der QC und der ERAD in Hefe wesentlich besser charakterisiert sind und nötige Mutanten vorhanden oder leichter zu generieren sind, wurde das humane Protein in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Die Mechanismen von QC und ERAD sind von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert. Frühere Studien belegen, dass in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiertes CFTR von Hefe-QC und ERAD erkannt und auch hier über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut wird.

In dieser Arbeit wurden neue Faktoren identifiziert, die an Qualitätskontrolle und ERAD von CFTR beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass das Hefe-ektin Htm1p in den Abbauprozess von CFTR involviert ist. Die Komplementation einer Htm1p-Defizienz in Hefezellen durch die Expression des Säuger-Orthologs EDEM bestätigte nicht nur die Bedeutung dieser Lektine für den Abbau von CFTR, sondern belegte zudem die hohe Übereinstimmung von QC und ERAD zwischen Hefe und Säuger. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Abbau von CFTR von den E3-Ligasen Der3p/Hrd1p und Doa10p abhängig ist. Der trimere Proteinkomplex Cdc48-Ufd1-Npl4 spielt eine entscheidende Rolle für den Abbau von CFTR ebenso, wie für einen verwandten ABC-Transporter der Hefe, Pdr5p.

## Summary

Many human diseases are caused by defects of single cell proteins or cellular mechanisms. Even if these are small effects they can still lead to dramatic, sometimes even lethal effects. Many of these defects are passed on from one to the next generation as a hereditary disease. One of these diseases is Cystic Fibrosis (CF). Cystic Fibrosis (CF) is the most common hereditary disease amongst the white population. It is caused by different mutations of the apical membrane ABC transporter *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Despite all efforts it is still an open question how to cure this disease and patients die at an average age of 30.

Basis of CF are mutations of the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). CFTR basically functions as a chloride channel in apical epithelia of various tissues. In most cases these mutations due to malfolding of the protein lead to the degradation of CFTR right after its synthesis at the endoplasmic reticulum (ER). In the ER secretory proteins are folded, modified and finally transported to their site of action (Glick, 2002; Haigh and Johnson, 2002). In addition the ER contains a highly active protein quality control mechanism (QC) which scans the folding process of the secretory proteins and retains those species which are unable to fold (Elgaard and Helenius, 2003). They are eliminated by a process called ER associated degradation (ERAD) via the ubiquitin proteasome system (Kostova and Wolf, 2003). The fate of CFTR protein is directly coupled to these processes. It is recognized by QC as being malfolded and subsequently degraded by ERAD. The most common mutation of CFTR which is found in 70% of all cases is a deletion of phenylalanin (F) at position 508 in the first of two nucleotide binding domains (NBD1). In mammalian cells  $\Delta F508$  is degraded to a rate of nearly 100%. Interestingly, even wild type CFTR is very unstable and shows a degradation rate of about 70% (Jensen *et al.*, 1995; Ward and Kopito, 1994). It is important to note that  $\Delta F508$  CFTR can still function as a chloride channel (Dalemans *et al.*, 1991) but due to QC and ERAD it fails to be transported to the apical plasma membrane. This could be overcome by lower temperature (Denning *et al.*, 1992), high glycerol (Sato *et al.*, 1996) or 4-phenylbutyrate (Rubenstein and Zeitlin, 2000). As neither of these treatments is of therapeutic value other solutions have to be searched for which could lead to mature  $\Delta F508$  CFTR at the plasma membrane. Therefore it is of great interest to uncover the components of QC and ERAD which are responsible for the elimination of  $\Delta F508$  CFTR. They may become targets for specific therapeutic interference and by this direct mutated CFTR to the cell surface.

Previous studies have shown that the lectin calnexin directly interacts with CFTR in the ER lumen (Pind *et al.*, 1994). Furthermore the bidirectional Sec61 translocon of the ER membrane was suggested to contribute to QC and ERAD (Bebök *et al.*, 1998) as well as the cytosolic chaperones Hsp70/Hsc70, Hsp90 and the co-chaperone CHIP (Yang *et al.*, 1993; Meacham *et al.*, 1999; Loo *et al.*, 1998; Meacham *et al.*, 2001). Still other unknown factors have to be involved in QC and ERAD of CFTR. These factors and their function on the CFTR-protein have to be elucidated.



It was the aim to express the whole CFTR protein in yeast cells to directly test the influence of known factors of QC and ERAD in the ER lumen and the cytosol in their influence on CFTR degradation. Cellular QC and ERAD are highly conserved mechanisms from yeast to man (Ellgaard and Helenius, 2003; Kostova and Wolf, 2002, 2003). The easy availability of yeast mutants defective in QC and ERAD makes this organism a preferred source for investigation of these processes. Indeed the expression of CFTR in *Saccharomyces cerevisiae* has proven that the yeast components of QC and ERAD recognize this protein and degrade it via the proteasome in a ubiquitin dependent manner (Kiser *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). These studies have uncovered the involvement of the yeast ubiquitin conjugating enzymes Ubc6p and Ubc7p as well as the cytosolic Hsp70 as necessary components for the degradation of CFTR. Influence of the ubiquitin protein ligase Der3p/Hrd1p has been discussed controversially (Kiser *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Recently the mammalian counterparts of yeast Ubc6p, Ubc7p and Der3p/Hrd1p have been identified (Lenk *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2001; Tiwari and Weissman, 2001). Thus *Saccharomyces cerevisiae* proves to be an excellent model organism to further investigate the components of the QC and ERAD which are required for the degradation of CFTR. Mutants defective in components newly discovered to be necessary for these mechanisms of malformed secretory yeast proteins opened the possibility to test their involvement in CFTR degradation. In this study it was discovered that the ubiquitin protein ligases Der3p/Hrd1p and Doa10p have some effect on the degradation of the CFTR protein. Furthermore the trimeric Cdc48-Ufd1-Npl4 complex is crucially required for proteasomal elimination of the protein. In addition the QC and degradation process of CFTR is considerably disturbed in a mutant defective in the lectin Htm1p. Most interestingly this defect can be complemented by the expression of the mammalian EDEM protein, showing that Htm1p and EDEM are functional homologues with respect to CFTR degradation.

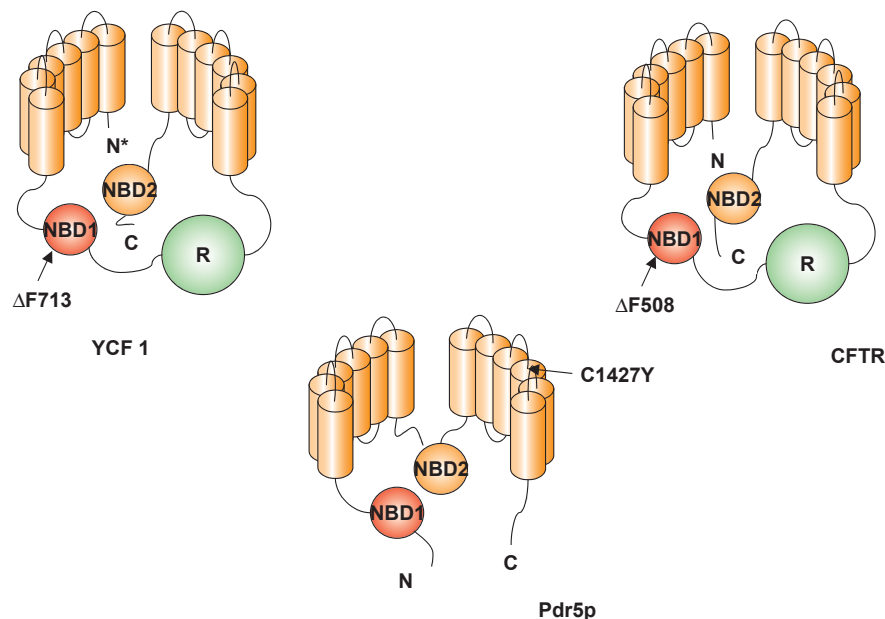
# Einleitung

## ABC-Transporter - eine weit verbreitete und wichtige Proteinfamilie

*ATP-binding cassette* (ABC) - Transporter finden sich in allen bekannten lebenden Organismen. Etwa 1.100 verschiedenen Transporter wurden bis heute beschrieben (Gottesmann and Ambudkar, 2001). Ursprünglich wurden sie als Transport-ATPasen in bakteriellen Plasmamembranen nachgewiesen. Heute kennen wir neben 16 ABC-Transportern in Hefe (Rogers *et al.*, 2001 / Michaelis and Berkower, 1995) auch etwa 50 dieser Transporter im Menschen. Die Proteinfamilie der ABC-Transporter ist durch Homologien in der *ATP-binding cassette* (ABC)-Region charakterisiert. Hoch konserviert sind vor allem die *Walker A* und *B*-Motive, welche für Interaktionen mit Nukleotiden wie ATP verantwortlich sind. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine, die für Transport- und Regulationsmechanismen von wesentlicher Bedeutung sind. Transportiert wird mehr oder weniger alles, was eine Zelle in irgendeiner Form verwenden kann, z.B. Aminosäuren, Zucker, Polysaccharide, Peptide, Proteine und anorganische Ionen, wobei jeder Kanal für sich sehr substratspezifisch arbeitet. Das an den jeweiligen Transporter gebundene ATP ist hierbei vor allem für die Regulation des Kanals von großer Bedeutung. Diese polytopen Proteine besitzen eine unterschiedliche Anzahl an hydrophoben Transmembransegmenten (TM), ein bis zwei zytoplasmatische Nucleotid-bindende Domänen (NBD) und zum Teil auch regulatorische Domänen (RD) mit Phosphorylierungsstellen, die, wenn vorhanden, im Zytosol lokalisiert sind.

Die ABC-Transporter der Hefe werden entsprechend ihrer Struktur in 5 Gruppen unterteilt. Zu den bekanntesten gehören Ste6p aus der *multidrug resistance protein*-Gruppe (Rine, 1979), der das a-Faktor Pheromon für den „geschlechtlichen“ Lebenszyklus aus der Hefe-Zelle exportiert und der 1504AS lange *pleiotropic drug resistance transporter* Pdr5p, auch Sts1p genannt (Leppert *et al.*, 1990; Balzi *et al.*, 1994; Bissinger and Kuchler, 1994; Hirata *et al.*, 1994), welcher überexprimiert verstärkte Resistenzen gegen Giftstoffe wie Cycloheximid, Chloramphenicol oder Sporidesmin vermittelt. PDR5 gehört der nach ihm benannten PDR5-Gruppe an, deren charakteristische Struktur eine Abfolge von N-Terminus-NBD1-TM-NBD2-TM-C-Terminus besitzt. Das Allel *pdr5-26* oder Pdr5\* trägt an Position 1427 im sechsten lumenalen Loop einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin (C1427Y), was zu Fehlfaltung, seinem Verbleib im ER und in der Folge zum Abbau über das Proteasom führt (Plemper *et al.*, 1998). Eine weitere Klasse ist die CFTR-Gruppe deren Proteine die Grundstruktur N-Terminus-TM-NBD1-RD-TM-NBD2 aufweisen. Benannt ist diese Gruppe nach dem CFTR-Protein aus Säugern, das ebenfalls diese Struktur aufweist und in mutierter Form die schwere Erbkrankheit Mukoviszidose auslöst. Auch wenn Hefe kein CFTR besitzt, so hat sie doch vier bekannte strukturverwandte Vertreter. Das am besten definierte ist YCF1 (Falcon-Perez *et al.*, 1999). Die Deletion eines Phenylalanins

an der Position 713 im Zentrum der NBD1 ( $\Delta F713$ ) führt wie bei  $\Delta F508$  CFTR zum Abbau des Proteins (Szczyпка *et al.*, 1994; Wemmie and Moye-Rowley, 1997).



**Abbildung 1. Struktureller Vergleich der Hefe-ABC-Transporter YCF 1 und Pdr5p mit humanem CFTR.** Die charakteristischen Mutationen in ihrer Lokalisierung gekennzeichnet, wobei C1427Y der Mutation *pdr5-26* / *pdr5\** entspricht. YCF 1 besitzt N-terminal einen großen hydrophoben Bereich, der bis zu 5 weitere TM-Segmente enthalten könnte (N\*).

Der einzellige Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* ermöglichen ABC-Transporter eine erhöhte Resistenz gegenüber bestimmten Medikament-Wirkstoffen und erschweren somit die Malaria-Therapie erheblich.

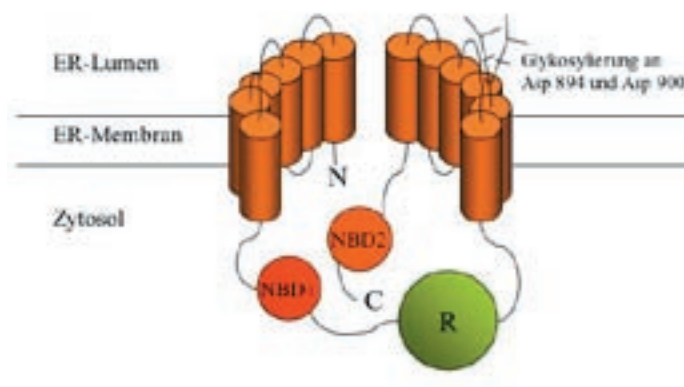
Als bekannteste menschliche ABC-Transporter gelten der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) und das *Multi Drug Resistance protein* (MDR). Letzteres findet sich verstärkt in Tumorzellen und macht diese resistenter gegen eine Vielzahl chemischer Therapeutika.

Häufig sind Mutationen in diesen komplizierten Proteinen auch direkt Auslöser von genetischen Krankheiten. So kennen wir beim Menschen momentan 13 verschiedene genetische Krankheiten, die auf Mutationen von 14 der bisher 50 bekannten ABC-Transporter beruhen. Dazu gehören das *Stargardt-Syndrom*, *Adrenoleukomyeloneuropathien* (peroxisomale Lipidspeicherkrankheiten), das *Dubin-Johnson-Syndrom*, das *Wilson-Syndrom* und die *Mukoviszidose* oder *Cystische Fibrose* (CF) (Gottesmann and Ambudkar, 2001).

## Mukoviszidose - Ursachen und Folgen einer unheilbaren Erbkrankheit

Mukoviszidose oder Cystische Fibrose (CF) ist die häufigste Erbkrankheit der weißen Erdbevölkerung. Die derzeitigen Therapieformen und Medikamente haben die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten mit Cystischer Fibrose zwar deutlich ansteigen lassen, so dass die meisten heute das Erwachsenenalter erreichen, jedoch ist eine die Symptome kontrollierende Therapie oder gar eine Heilung nach wie vor nicht erkennbar. Es gibt verschiedene Ansätze die Krankheit zu heilen. Solche sind die Gentherapie, bei der die gesunde Erbinformation in betroffene Zellen eingebracht werden soll und das *Multidrug Screening*, mit dessen Hilfe nach chemischen Stoffen gefahndet wird, die eine therapeutisch relevante Wirkung auf das betroffene Protein ausüben. Einer gezielten Therapie muss allerdings die Aufklärung der zellbiologischen Prozesse, die zum Abbau des betroffenen Proteins führen, voraus gehen.

Auslöser der Mukoviszidose sind Mutationen in einem Gen, das für einen ABC-Transporter in Apikalmembranen verschiedener Epithelzellen des Körpers kodiert (z.B. in Lunge, Magen-Darm-Trakt und Schweißdrüsen), dem sogenannten *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR).



**Abbildung 2. Struktur des humanen ABC-Transporters CFTR.** Der Transporter ist schematisch dargestellt. Die Grafik zeigt ihn an der ER-Membran lokalisiert, wie es in der frühen Reifung zu erwarten ist. Er besteht aus den 12 Transmembransegmenten (TM / tonnenförmig), der Nukleotidbindedomäne 1 (NBD1 / rote Kugel), der regulatorischen Domäne (R / grüne Kugel) und der Nukleotidbindedomäne 2 (NBD2 / orange Kugel). Die zwei N-Glykosylierungsstellen am 4. lumenalen Bogen tragen die bäumchenförmigen Zuckerreste.

Seine Sequenz umfasst 1480bp. Strukturell besteht er neben 12 Transmembrandomänen (TM) aus 2 Nukleotidbindedomänen (NBD) und einer regulatorischen Domäne (RD) (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989). Das Protein wird an den Asparagin-Resten 894 und 900 im 4. extrazellulären Bogen glykosyliert (Cheng *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1994; O’Riordan *et al.*, 2000) und bildet in seiner *core*-glykosylierten Form ein Protein von etwa 150kDa, in seiner reifen Form eines von

etwa 170kDa. Dieser Kanal fungiert in erster Linie als Chlorid-Kanal in den Apikalmembranen von Epithelzellen (Quinton 1983 / Welsh and Liedtke, 1986). Außerdem reguliert er Natrium-Epithel-Kanäle (ENaC) (Schreiber *et al.*, 1999 / Stutts *et al.*, 1997) und ist eventuell auch an weiteren zellulären Prozessen wie etwa der Modulation des ROMK2 Kalium-Kanals (McNicholas *et al.*, 1996), des Bicarbonattransportes und des intrazellulären pH beteiligt (Poulsen *et al.*, 1994 / Kunzelmann, 1999).

Man kennt heute über 900 verschiedene Mutationen, die aufgrund ihres Defektes am Protein in 5 Klassen eingeteilt werden: 1. keine Synthese, 2. defekte Reifung des Proteins, 3. defekte Regulation, 4. defekte Leitfähigkeit, 5. verminderte Proteinmenge. Bei den Klasse 2-Mutationen werden mutierte CFTR-Kanäle vermutlich auf Grund ihrer leicht veränderten Proteinstruktur als fehlgefaltet oder "krankhaft" von der Qualitätskontrolle (QC) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle erkannt, dort zunächst festgehalten und schließlich dem Abbau zugeführt (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Zu diesen Klasse 2-Mutationen zählt auch die weitaus häufigste Mutation, die bei etwa 70% aller Patienten auftretende Deletion des Phenylalanin an Position 508 ( $\Delta F508$ ) in der Nucleotidbindedomäne 1 (NBD1) (Kerem *et al.*, 1989). Werden üblicherweise etwa 70% des WT-Proteins abgebaut, so werden annähernd 100% dieser mutierten Form dem Abbau zugeführt, ohne dass es zu einer vollständigen Reifung und dem Austransport an die apikale Plasmamembran, den eigentlichen Wirkort von CFTR kommt (Cheng *et al.*, 1990). Es wurde festgestellt, dass das  $\Delta F508$  Protein trotz Fehlfaltung seine Aufgaben als Chloridkanal erfüllen kann, wenn es in die Apikalmembran der Zellen eingebaut wird (Dalemans *et al.*, 1991). Als ein wesentlicher Aspekt bezüglich möglicher Therapieansätze würde ein wieder hergestellter Austransport des  $\Delta F508$ -CFTR eine weitestgehende Heilung von zumindest 70% aller Patienten bedeuten. Durch *in vitro* Versuche mit Temperaturerniedrigung (Denning *et al.*, 1992), Glycerinbehandlung (Sato *et al.*, 1996) und 4-Phenyl-Butyrat (Rubenstein and Zeitlin, 2000) konnte gezeigt werden, dass hierdurch der Abbau des mutierten Proteins verhindert oder zumindest vermindert und dadurch CFTR in die Apikalmembran eingebaut wird. Vermutlich beruhen diese stabilisierenden Effekte verschiedener chemischer Chaperone auf der Stabilisierung bestimmter nativer Konformere oder der Verminderung von Protein-Aggregaten. Wären entsprechende Faktoren bekannt, die das mutierte CFTR-Protein stabilisierten oder ihren Einbau in die Zellmembran ermöglichten, und wären diese im Gegensatz zu den bekannten Einflüssen klinisch einsetzbar, hätte man zumindest für die  $\Delta F508$ -Mutanten und somit für 70% aller Patienten eine vielversprechende Therapieoption. Für die Identifizierung solcher Faktoren ist die Aufklärung der zellulären Qualitätskontrolle (QC) und der folgenden Abbaumechanismen von fehlgefaltetem CFTR die notwendige Voraussetzung. Neben direkten, aber aufwendigen und langwierigen Versuchen mit menschlichen Zelllinien bietet der Modellorganismus Bäckerhefe grundsätzlich die Möglichkeit der Bearbeitung solcher Fragestellungen. Eignet sie sich aber auch für Versuche mit großen polytopen Transmembranproteinen wie CFTR?

## Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Einer der bekanntesten und potentesten Modellorganismen zur Aufklärung zellulärer Prozesse in einer Eukaryotenzelle ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Als einzellige Pilze werden sie in der Familie *Saccharomycetaceae* zusammengefasst. Wie der Name bereits andeutet, gehört *Saccharomyces cerevisiae* zu den Sprosshefen (*Saccharomycetoidae*) und wird seit Jahrhunderten von Menschen als Bier- oder Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) oder als Weinhefe (*S. ellipsoideus*) genutzt. Sie zählt aufgrund leichter Handhabung und eines für Eukaryoten überschaubaren Genoms schon seit vielen Jahren zu den erfolgreichsten eukaryotischen Modellorganismen in der Forschung. Die 16 Chromosomen in einer haploiden Hefezelle tragen etwa 6000 Gene, deren Sequenz seit 1996 vollständig bekannt ist (Goffeau *et al.*, 1996 / Dujon, 1996); im Vergleich zu den etwa 30.000 Genen des Menschen eine überschaubare Anzahl. Von etwa der Hälfte der Geninformationen der Hefe kennt man heute die Funktion. Grundlegende zelluläre Mechanismen, etwa die der Genregulation, Proteinsynthese und des Proteinabbaus und andere sind von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert und zum Teil sogar direkt austauschbar (Komplementation). Methodische Vorteile der Hefe liegen in den einfachen Kultivierungsmöglichkeiten und den relativ kurzen Verdopplungszeiten (ca. 90min in Vollmedium). Weiterhin bietet die Hefe auf molekularbiologischer Ebene einmalige Möglichkeiten der Genmanipulation, etwa aufgrund ihrer Fähigkeit zur homologen Rekombination, über welche mit vergleichsweise einfachen Mitteln gezielt Mutationen oder Deletionen in das Hefegenom eingebaut werden können. Somit ermöglicht die Hefe Forschung an zellulären Vorgängen wie sie sich auch in Säugerzellen abspielen unter deutlicher Reduktion zeitlicher und materieller Mittel. Außerdem sind gerade in Bezug auf QC und ERAD wesentlich mehr Fakten aus Hefe als aus Säugerzellen bekannt. Gleichzeitig besteht ein hoher Grad an Homologie auch gerade in diesen Mechanismen (Brodsky and McCracken, 1999; Hartl, 1996; Lenk *et al.*, 2002; Sommer and Wolf, 1997; Zhang *et al.*, 2001), Gründe, die auch diese Forschungsarbeit auf dem Hefe-System aufbauen ließen.

### Mukoviszidose in Hefe?

Auch wenn *S. cerevisiae* kein direktes Homolog zu CFTR besitzt und natürlich auch nicht das entsprechende Krankheitsbild zeigen kann, so hat sie doch Proteine, die wie CFTR zur Klasse der ABC-Transporter zählen (z.B. STE6, PDR5, YCF1). Als nächster Verwandter muss YCF1 angesehen werden. Es ist strukturell wie CFTR aufgebaut (TM-NBD1-R-TM-NBD2) und besitzt als einziger Hefe-ABC-Transporter eine regulatorische (R)-Domäne. Auch führt eine vergleichbare Mutation, der Verlust eines Phenylalanins an der Position 713 in der NBD1 ( $\Delta F713$ ) zum Abbau des Proteins (Falcon-Perez *et al.*, 1999; Szczycka *et al.*, 1994; Wemmie and Moye-Rowley, 1997).

Die Nutzbarmachung der Hefe für die Erforschung grundlegender Prozesse des medizinisch höchst relevanten humanen Proteins CFTR begann 1993 mit Versuchen an einer sogenannten

Chimäre, einem Mischprotein aus dem Hefe-ABC-Transporter STE6 und humanem CFTR mit der unveränderten, bzw. der mutierten NBD1 ( $\Delta F508$ ) (Teem *et al.*, 1993). Dabei wurde eine Mutante R 553 M gefunden, die  $\Delta F508$ -CFTR stabilisieren konnte und eine leicht verstärkte Exposition des Proteins an der Apikalmembran von HeLa-Zellen zeigte. Eine  $\Delta F508$  homologe Deletion in Ste6p ( $\Delta L455$ ) zeigte keinen defekten Phänotyp (Berkower and Michaelis, 1991).

Huang und Kollegen (Huang *et al.*, 1996) zeigten, dass in Hefe synthetisiertes CFTR in künstlichen Lipidschichten seine Kanalfunktion ausübte, also funktionstüchtig war. Erst jüngere Untersuchungen aus dem Jahr 2001 richteten sich direkt auf die Aufklärung der Mechanismen, die in der QC zur Markierung des Proteins und schließlich zum ER-assoziierten Abbau (ERAD) über das Proteasom führen. Die Arbeiten von Kiser *et al.*, 2001 und Zhang *et al.*, 2001 zeigten, dass CFTR in Hefe glykosyliert und poly-ubiquitiniert wird. Ein Transport über das ER hinaus konnte nicht sicher nachgewiesen werden. Dafür konnte aber der Abbau über die Vakuole ausgeschlossen und die Eliminierung über das Ubiquitin-Proteasom-System mittels Inhibitoren und proteasomaler Mutanten belegt werden. Auch die Deletion der E2-Enzyme Ubc6p und Ubc7p verlangsamte den Abbau des heterolog exprimierten CFTR. Die Deletion des Hefe-E3-Proteins Der3p/Hrd1p zeigte nur bei Kiser *et al.*, 2001 nicht jedoch bei Zhang *et al.*, 2001 einen signifikanten Einfluss auf den Abbau von CFTR.

Auch das Hsp70-Hefehomolog Ssa1p zeigte wie Hsp70 im Säugerzellsystem einen Einfluss auf den Abbau von CFTR. Das Calnexin-Hefehomolog Cne1p (Parlati *et al.*, 1995) beeinflusste die Abbaurate von CFTR nicht, obgleich Calnexin mit CFTR in Säugerzellen interagiert. Nach neuen Erkenntnissen dürfte Calnexin und somit wohl auch Cne1p kein Abbau einleitendes, sondern eher ein Faltungsprotein sein, dessen Substrat bei entsprechenden Rahmenbedingungen von einem strukturverwandten Protein (Säuger-EDEM / Hefe-Htm1p) übernommen wird, welches den Abbau einleitet (Oda *et al.*, 2003; Molinari *et al.*, 2003).

Nach Zhang *et al.* (2001) wird durch CFTR-Expression in Hefe kein UPR induziert. Allerdings treten, wie auch in Zellkultur beobachtet (Lukacs *et al.*, 1994; Van Oene *et al.*, 2000), Intermediate bei 80 bis 120kDa auf, die vermutlich auf proteolytische Schnitte in der NBD1 und / oder der R-Domäne zurückzuführen sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Hefe zwar das Krankheitsbild Mukoviszidose nicht kennt, aber dennoch als Organismus für die Erforschung der grundlegenden Prozesse von QC und ERAD von CFTR ein geeignetes Modell darstellt.

## Prozessierung und Abbau im sekretorischen System

Proteine werden an Ribosomen im Zytosol synthetisiert. Ihre Verteilung auf die verschiedenen zellulären Organellen, in die Plasmamembran oder aus der Zelle heraus wird durch das sekretorische System reguliert. Ihre Zieladresse tragen sekretorische Proteine in einer N-terminalen Peptidsequenz aus 15 - 20 hydrophoben Aminosäuren, die während der Reifung im ER abgeschnitten wird. Im ER erhalten die Proteine ihre globuläre Struktur und zusätzliche spezifische Modifikationen. Außerdem werden sie hier einer Qualitätskontrolle unterzogen, in der ihre korrekte Struktur geprüft wird. Nur korrekt gefaltete Proteine können das ER in den sekretorischen Weg verlassen. Dafür werden sie über spezifische Rezeptoren in der ER-Membran, wie etwa das Lektin ER-Golgi-Intermediate-Compartment (ERGIC)-53 und COPII-Transportvesikel (Barlowe, 2002) zum Golgi-Komplex transportiert. Der Golgi-Komplex ist der Ort der Endreifung und der Verteilung der Proteine an ihren Wirkungsort. Faltung und Qualitätskontrolle wie im ER finden nicht statt. Über Vesikel gelangen die Proteine dann an ihre Zielorte, etwa über Endosomen zum Lysosom (Hefe: Vakuole) oder über sekretorische Vesikel an die Plasmamembran oder durch Exozytose in den extrazellulären Raum. Reifes CFTR-Protein gelangt in Säugerzellen über diesen Weg an seinen Wirkort, die apikale Plasmamembran verschiedener Epithelien. Da CFTR eine sehr geringe Faltungseffizienz erreicht, werden in Säugerzellen nur etwa 30% des synthetisierten Proteins in den sekretorischen Weg entlassen. 70% des Wildtyp-Proteins werden ebenso wie nahezu 100% des mutierten  $\Delta F508$ -CFTR bereits im ER zurückgehalten und schließlich dem Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt. In Hefezellen werden beide Formen zu nahezu 100% abgebaut. Maßgeblich für die Zurückhaltung im ER ist die zelluläre Qualitätskontrolle.

### Qualitätskontrolle im ER

Neu synthetisierte sekretorische Proteine erhalten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ihre globuläre Grundstruktur. Ausschlaggebend für die Ausbildung dieser Struktur sind die verschiedenen physikalischen Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten und die Knüpfung von Schwefelbrücken durch Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (Regeimbal and Bardwell, 2002) sowie weitere Modifikationen. Zu diesen gehören die Signalpeptid-Abspaltung durch die membranständige Signalpeptidase, das Anhängen von Glykophosphatidylinositol (GPI)-Ankern und das Anhängen von Zuckergrundgerüsten an spezifische Glykosylierungsmotive (Asn-X-Ser / Asn-X-Thr) (sog. *core glycans*), die sofern sie vorhanden sind, später im Golgi-Apparat ihre endgültige Form erhalten. Für die Faltung besitzen Zellen sowohl im Zytosol als auch im ER Faltungshelferproteine, sogenannte Chaperone. Aufgabe der Qualitätskontrolle (QC) ist die Überprüfung dieser Faltungs- und Modifikationsprozesse neu synthetisierter, reifender Proteine. Im Falle von Fehlfaltung greift sie als eine Art „*Checkpoint control*“ ein, der solche fehlerhaften



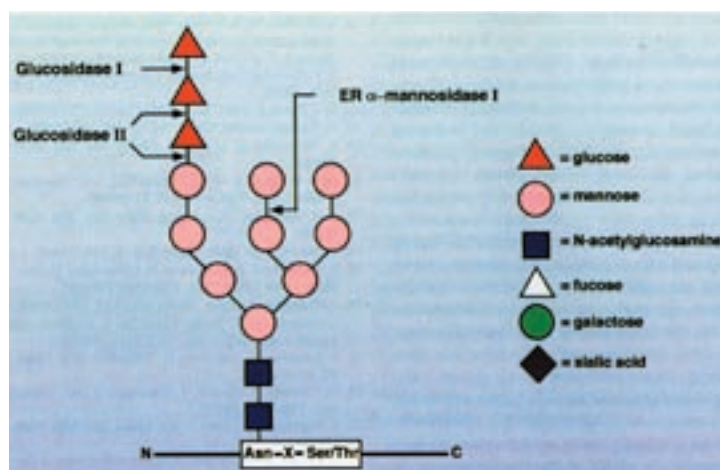
Proteine erkennt, ihren Transport aus dem ER verhindert und dem Abbau zuführt (Ellgaard *et al.*, 1999), um so die Zelle vor negativen oder gar toxischen Auswirkungen zu bewahren. Die genauen Abläufe der Qualitätskontrolle sind nach wie vor nicht voll verstanden, sie basieren aber sehr sicher auf strukturellen, und nicht auf funktionellen Kriterien. Wichtige Erkennungsmerkmale für die Qualitätskontrolle sind freiliegende hydrophobe Proteinbereiche, freie Cysteinreste und die Tendenz einiger Proteine zu aggregieren (Ellgaard and Helenius, 2003). Im Zytosol von Säugerzellen verhindern verschiedene Chaperone wie Hsp70 und eines seiner Co-Chaperone, Hsp40, aber auch Hsp90 die Aggregation ungefalteter, hydrophober Proteinsequenzen. Ihre Funktion ist allerdings bivalent. Denn abhängig vor allem von ihren interagierenden Co-Faktoren können diese Faltungshelfer auch als Abbau fördernde Faktoren wirken (siehe unter ER assoziierte Degradation). Das lumenale Hsp70-Chaperon BiP (Kar2p in Hefe) ist ebenfalls bekannt dafür, an hydrophobe Proteinbereiche zu binden, etwa zum post-translationalen Proteinimport ins ER und für die Faltung und Anordnung des Proteins im ER (Johnson and van Waes, 1999; Haigh and Johnson, 2002). Allerdings ist Kar2p nur für den Abbau löslicher Proteine von Bedeutung. Membranproteine werden unabhängig davon geprüft, exportiert und abgebaut (Plemper *et al.*, 1998 / Taxis and Wolf, 2003). Weitere Faltungssensoren im ER von Säugerzellen sind das Glukose-regulierte Protein Grp94 (einzig bekanntes lumenales Protein der Hsp90-Familie) und die Thiol-Disulphid-Oxidoreduktasen Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und Erp57 (Ellgaard and Helenius, 2003).

Ein wesentlicher Faktor der Qualitätskontrolle ist die Glykosylierung von Proteinen im ER. Bei der co-translationalen N-Glykosylierung im ER wird über den sogenannten Oligosaccharyl-Transferase (OST)-Komplex durch eine Oligosaccharyltransferase spezifisch eine Glucose (Glc)3-Mannose (Man)9-N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc)2-Glykanstruktur von einem membranständigen Dolicholanker über das erste N-Acetyl-Glucosamin an den freien Stickstoff eines Asparagin in der Erkennungssequenz (Konsensussequenz) Asn-X-Ser bzw. Asn-X-Thr gebunden (Helenius und Aebi, 2001). Voraussetzung dafür ist allerdings, dass das Asparagin bereits 12-14 Aminosäuren vom Translokation entfernt und strukturbezogen frei zugänglich ist (Nilsson and vonHeijne, 1993). Im Rahmen des sogenannten Glykosylierungs-*Timers* (Andersson *et al.*, 1996; Helenius und Aebi, 2001) wird die N-Glykan Grundstruktur anschließend von den Enzymen Glucosidase I und II zunächst zu Glc1 Man9-GlcNAc2 reduziert. In Säugerzellen wird diese monoglykosylierte Struktur von dem membranständigen Lektin Calnexin und seinem löslichen Gegenpart Calreticulin erkannt und gebunden. Nach Molinari *et al.*, 2003 und Oda *et al.*, 2003 besitzt Calnexin zusätzlich Proteinbindedomänen.

Sind freie Schwefelgruppen an Cysteinresten des sich faltenden Glykoproteins vorhanden, werden an diesen kovalente Schwefelbrücken von der Oxidoreduktase Erp57 ausgebildet. Dieses Enzym wird über die Interaktion mit Calnexin und Calreticulin mit dem zu faltenden Protein assoziiert (Oliver *et al.*, 1997 und 1999; Molinari and Helenius, 1999).

Wird auch noch der letzte Glukoserest am faltenden Protein durch Glukosidase II abgespalten,

zerfällt der Komplex und setzt ein Protein mit der Struktur Man9-GlcNAc2 frei. Ist das Protein noch nicht korrekt gefaltet, kann die bisher nur in Säugerzellen identifizierte UDP-Glukose Glycosyltransferase (UGGT) an das Protein binden und an dieselbe Stelle einen Glukoserest anknüpfen (Arnold *et al.*, 2000; Parodi, 2000). Daraufhin kann das Protein wieder von Calnexin, Calreticulin und Erp57 gebunden werden und einen weiteren Faltungszyklus durchlaufen. Interessanterweise bindet UGGT weder an ungefaltete, noch an fertig gefaltete Proteine. Sie muss demnach in der Lage sein, das Faltungsstadium der Proteine zu erkennen (Parodi, 2000). Eventuell sind hierbei freiliegende hydrophobe Bereiche partiell gefalteter Proteine von Bedeutung (Caramelo *et al.*, 2003). Ist das Protein aus irgendwelchen Gründen, z.B. aufgrund einer Mutation, nicht in der Lage, richtig gefaltet zu werden, reduziert die langsam agierende Mannosidase I den Man9-GlcNAc2-Zuckerrest durch Abspalten der  $\alpha$ 1,2-gekoppelten Mannose des mittleren von drei Zweigen zu einem *Core Glycan* der Struktur Man8-GlcNAc2.



**Abbildung 3. Trimierung des „Core“-Glykans im ER-Lumen (aus Helenius und Aebi, 2001).** Gezeigt sind die Struktur des „Core“-Glykans und die Schnittstellen der modifizierenden Enzyme, die in der Abfolge Glukosidase I, Glukosidase II und ER- $\alpha$ -Mannosidase I agieren.

Nur korrekt gefaltete Proteine mit der Man9-Struktur können das ER über den sekretorischen Weg verlassen und weiter reifen. Proteine mit einer Man8-Glykan-Struktur werden von einem neu identifizierten spezifischen Lektin EDEM (Säuger / Hosokawa *et al.*, 2001), bzw. Htm1p (Hefe) gebunden, dadurch dem Calnexin-Calreticulin-Faltungs-Zyklus entzogen im ER zurückgehalten und dem Abbau über das Proteasom zugeführt (Helenius and Aebi, 2001).

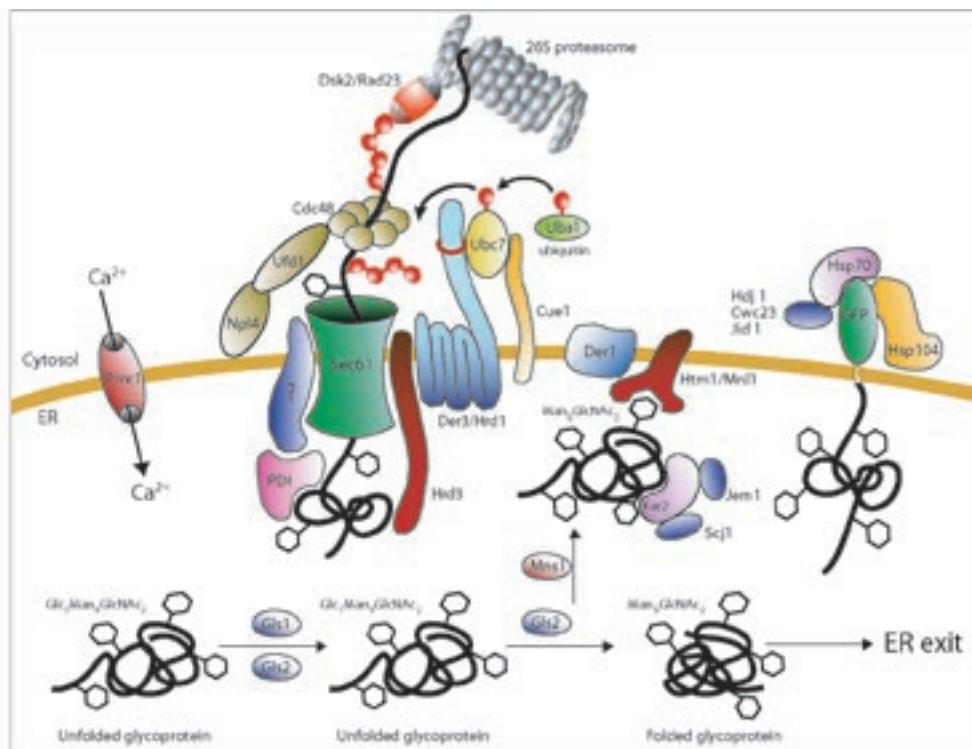
Das System der Hefe gleicht dem aus Säugerzellen weitestgehend. Es wurde jedoch bis heute kein UGGT analoges Hefeprotein identifiziert, so dass eine Reglukosylierung nach bisherigem Kenntnisstand in Hefe nicht erfolgt. Der Einfluss der Enzyme Glukosidase I und II und Mannosidase I auf den Abbau nicht richtig gefalteter Proteine wurde in Hefe aber ebenso aufgezeigt (Knop *et al.*, 1996; Jakob *et al.*, 1998) wie der Einfluss des Lektins Htm1p (Jakob *et al.*, 2001). So ist der Abbau des polytopen glykosylierten ABC-Transporters Pdr5p\* (Plemper *et al.*, 1998) abhängig von den genannten Proteinen, das unglykosylierte Sec61-2p (Biederer *et al.*, 1996) hingegen wird völlig unabhängig von Htm1p abgebaut.

Wie stark der Einfluss dieser Mechanismen letztendlich für den Gesamtprozess ist, ist schwer einzuschätzen. Sicher ist jedoch, dass einige Glykoproteine durch Störungen dieser Maschinerie zu unterschiedlich starken Graden stabilisiert werden können.

Auch CFTR durchläuft als Glykoprotein diesen Glykosylierungs-*Timer*. Calnexin bindet in Säugerzellen wie erwartet an das CFTR-Protein (Pind *et al.*, 1994). Dagegen zeigt das Hefehomolog Cne1p keinen Einfluss auf den Abbau von CFTR und CPY\* in Hefe (Zhang *et al.*, 2001; Knop *et al.*, 1996). Eine direkte Interaktion zwischen Cne1p und CFTR in Hefe wurde noch nicht untersucht. Allerdings ist Cne1p in den Abbau des mutierten, nicht glykosylierten pro- $\alpha$  Faktors involviert (McCracken and Brodsky, 1996), was Lektin unabhängige Funktionen vermuten lässt. Neueste Berichte von Oda *et al.*, 2003 und Swanton *et al.*, 2003 zeigen Glykosylierungs-unabhängige Proteinbindedomänen in der Calnexinsequenz. Am Beispiel von CFTR wird weiterhin deutlich, dass für die erfolgreiche Sekretion eines Proteins die Stabilität der Konformation des nativen, gefalteten Proteins im Vergleich zu seiner noch nicht gefalteten Form von wesentlicher Bedeutung ist. Je stabiler die Faltung, desto effizienter und schneller gelangt ein Protein aus dem ER in den sekretorischen Weg (Ellgaard and Helenius, 2003). Im Falle von CFTR konnte durch Strukturstabilisierung bei niedrigeren Temperaturen, bzw. durch Zugabe von Glycerin oder 4-Phenylbutyrat die Exportrate des Proteins zur Apikalmembran deutlich angehoben werden (Denning *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1996; Rubenstein and Zeitlin, 2000).

## **ER assoziierte Degradation (ERAD)**

Fehlgefaltete Proteine, die von der Qualitätskontrolle im ER zurückgehalten werden, gelangen über einen Retrotranslokationskanal aus dem ER ins Zytosol. Gleichzeitig werden sie durch das Ubiquitinierungssystem markiert und über das Proteasom abgebaut (ERAD / Plemper and Wolf, 1999; Brodsky and McCracken, 1999). Die Rolle zytosolischer Chaperone für den Abbau lumenaler Substrate ist noch weitgehend ungeklärt. Membranproteine hingegen zeigen bezüglich ihrer Faltung eine deutliche Abhängigkeit von zytosolischen Hilfsproteinen. So wurden speziell für CFTR in Säugerzellen Einflüsse von Proteinen der Hsp70-Familie (Hsp70/Hsc70) (Bercovich *et al.*, 1997; Choo-Kang and Zeitlin, 2001), der Co-Chaperonfamilie Hsp40/Hdj-2 (Farinha *et al.*, 2002; Meacham *et al.*, 1999), CHIP, das als E3-Enzym fungiert (Jiang *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001) und Hsp90 (Loo *et al.*, 1998) gezeigt. Hsc 70 dient wahrscheinlich als Helfer für den Abbau, da es wesentlich stärker mit der sich schlechter faltenden, mutierten NBD 1 von CFTR ( $\Delta$ F508) komplexiert als mit der intakten Form (Meacham *et al.*, 1999), während Hsp70 eher stabilisierend zu wirken scheint (Choo-Kang and Zeitlin, 2001). Ein weiteres Co-Chaperon von Hsp/Hsc70 ist CHIP, das die Ubiquitinierung von CFTR fördert (Meacham *et al.*, 2001). Hsp 90 scheint dem Abbau entgegenzuwirken (Loo *et al.*, 1998). Die genaue Bedeutung dieser Chaperone für die Prozessierung von Wildtyp- bzw.  $\Delta$ F508-CFTR wird diskutiert. Auch die Frage, welche anderen Chaperone an der Faltung und Degradation des CFTR-Proteins beteiligt sind, ist noch weitgehend ungeklärt.



**Abbildung 4. Schematisches Modell des ERAD und seiner beteiligten Faktoren.** Der unterschiedliche Chaperonbedarf zwischen löslichen und membranständigen Glykoproteinen mit zytosolischen Domänen (GFP) ist dargestellt.

Wie im Säugersystem konnte der Einfluss der bekannten cytoplasmatischen Proteine Hsp70, 40 und 104 auf die ER-Degradation auch im Hefesystem mit Hilfe eines chimären CPY\*-Transmembranproteins mit zytosolisch lokalisiertem GFP, dem sogenannten CTG\* nachgewiesen werden (Taxis and Wolf, 2003). Im Gegensatz dazu hatten diese Proteine weder Einfluss auf den Abbau von CPY\*, noch auf den Abbau des chimären membranständigen Proteins CT\*, welches keine zytosolische Domäne besitzt. Somit scheint eine Abhängigkeit des ER-Abbaus fehlgefalteter Proteine von zytosolischen Chaperonen nur für solche mit zytosolischen Domänen zu bestehen.

Fehlgefaltete Proteine müssen für den Abbau aus dem ER oder der ER-Membran über den Retrotranslokationskanal wieder ausgeschleust werden (Retrotranslokation oder Dislokation) (Hiller *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1996; Wiertz *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997). Denn mit dem Proteasom befindet sich die Abbaumaschinerie dieser Proteine im Zytosol. Für den Retrotranslokationsprozess gibt es zwei grundlegende Modelle. Zum einen wird ein direkter Kontakt der zum Teil translozierten Proteine mit dem Proteasom vorgeschlagen, das hierzu an der ER-Membran sitzen müsste und über seine 19S *cap* ATPasen (siehe Proteasom) diese Proteine herausziehen würde (Mayer *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2001). Dass Ubp1p, eine E3-Ligase, und verschiedene Ubiquitin konjugierende E2-Enzyme als *in vitro*-Interaktionspartner verschiedener 19S-Untereinheiten des Proteasoms gefunden wurden (Xie and Varshavsky, 2000; Tongaonkar *et al.*, 2000), könnte im Sinne einer direkten Interaktion von abzubauenem Protein und Proteasom an der ER-Membran

interpretiert werden. Weiterhin konnte das Proteasom bereits in direkter Assoziation mit der ER-Membran gezeigt werden (Rivett *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1996).

Das zweite Modell geht von einem Chaperon- oder Transportprotein-getriebener Prozess aus. Dieses Modell erhielt entscheidenden Auftrieb durch die Identifizierung eines trimeren Proteinkomplexes bestehend aus der AAA-ATPase Cdc48p (p97) (Moir *et al.*, 1982) und ihren zwei assoziierten Proteinen Npl4p und Ufd1p in Hefe und Säugerzellen (Hitchcock *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2000; Rape *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex für den sukzessiven Extraktionsprozess einer Vielzahl bisher getesteter Modellproteine von entscheidender Bedeutung ist (Bays *et al.*, 2001a; Bays and Hampton, 2002; Ye *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002). Eine durch Mutationen in den Komponenten des trimeren Proteinkomplexes ausgelöste defekte Extraktion der getesteten Proteine führt zu ihrer Anhäufung an der ER-Membran. Es ist noch unklar, welche Faktoren eventuell zwischen Cdc48p und dem Abbau der Proteine am Proteasom eine Rolle spielen.

Grundvoraussetzung für die vollständige Retrotranslokation aus dem ER ist die Polyubiquitinierung der fehlgefalteten Proteine. Eine fehlende Polyubiquitinierung führt zum weitgehenden Verbleib der fehlgefalteten Proteine im ER (Hiller *et al.*, 1996; Biederer *et al.*, 1997; Bordallo *et al.*, 1998; Shamu *et al.*, 2001).

Ubiquitin ist ein 76 AS kleines, in allen Eukaryoten hochkonserviertes, lösliches Protein, 1996), das über eine Isopeptidbindung seines C-terminalen Glycins mit dem N-Terminus oder der  $\epsilon$ -Gruppe eines internen Lysinrestes des Zielproteins gekoppelt wird (Hershko and Ciechanover, 1998). Nur wenige Ausnahmen wie der mutierte pro- $\alpha$  Faktor (Werner *et al.*, 1996) werden, obgleich sie nicht ubiquitiniert sind, vom Proteasom abgebaut. Die Ubiquitinierungsmaschinerie sitzt an der zytosolischen Seite der ER-Membran und besteht grundsätzlich aus drei verschiedenen Komponenten, den Ubiquitin aktivierenden E1-Enzymen (in der Hefe Uba1p), den Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzymen (in Hefe Ubc1-8, 10, 11 und 13) und den Ubiquitin-Ligasen, den sogenannten E3-Enzymen. Zur Aktivierung des Ubiquitins wird sein C-terminaler Glycin-Rest unter ATP-Verbrauch in Form einer energiereichen Thioesterbindung an ein aktivierendes Enzym E1 gebunden. Dabei wird kurzzeitig ein Ub-AMP-Zwischenprodukt unter Freisetzung von PPI gebildet. Ubiquitin wird dann auf einen Cystein-Rest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen. In einem dritten Schritt wird Ubiquitin schließlich über seinen C-Terminus in einer Isopeptid-Kopplung an eine  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Lysin-Restes des zu markierende Proteins gebunden. Dies geschieht über eine Ub-Protein-Ligase E3 (Ubl), die entweder das Ubiquitin direkt bindet und dann koppelt (etwa die *Hect*-Domänen-Familie der E3s) oder nur die Übertragung des Ubiquitins von E2 auf das Protein vermittelt. Nach der Kopplung des ersten Ubiquitins an ein Protein wird an einen seiner Lysin-Reste (meist Lys48) das nächste Ubiquitin über dessen C-Terminus gekoppelt und so eine ganze Ubiquitin-Kette angehängt. Für den proteasomalen Abbau ist eine Kette von mindestens 4 Ub-Molekülen notwendig (Thrower *et al.*, 2000).

Die E3-Enzyme lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen unterteilen:

HECT-Domänen-Enzyme enthalten eine zum Carboxyterminus des humanen E6-AP Proteins homologe Sequenz. E6-AP ein am Abbau des Tumorsuppressors p53 beteiligtes E3 (Scheffner *et al.*, 1990). Diese Enzyme bilden direkt Thioesterbindungen mit Ubiquitin und übertragen dieses anschließend auf das Substrat (Smith *et al.*, 1996). Zu dieser Gruppe gehören in der Hefe die Proteine Rsp5p/Nsi1p, Tom1p und Ufd4p und zwei weitere, noch nicht näher charakterisierten Proteine.

Die zweite und deutlich größere Gruppe bilden die RING (*Really Interesting New Gene*)-Finger E3s. Sie zeichnen sich durch den RING-Finger aus, eine dem Zink-Finger verwandte Domäne mit sechs Cysteinen und zwei Histidinen (RING-H2) bzw. sieben Cysteinen und einem Histidin (RING-HC). Von diesen Aminosäuren werden meist zwei Zink-Ionen komplexiert (Jackson *et al.*, 2000). Ob alle der bisher bekannten etwa 40 RING-Finger Proteine auch als E3-Enzyme fungieren, ist schwer zu sagen, da die Wirkweise aller noch nicht geklärt wurde. RING-Finger E3s bilden keine Thioester-Verbindungen mit Ubiquitin aus, sondern vermitteln vielmehr indirekt die Ubiquitinierung des Substrats über das E2-Enzym (Joazeiro and Weissman, 2000; Jackson *et al.*, 2000). Zu den RING-Finger Proteinen werden auch die SCF-Proteinkomplexe gezählt, wobei nur das mit den E2-Enzymen interagierende Protein dieser Komplexe tatsächlich eine RING-Domäne besitzt (Jackson and Eldridge, 2002; Skowyra *et al.*, 1997). Das zu ubiquitinierende Substrat wird über sogenannte F-Box-Proteine an den Komplex gebunden. Dieser Ubiquitinierungskomplex wurde zunächst in Zusammenhang mit Zellzyklusregulationsmechanismen identifiziert (Zachariae and Nasmyth, 1999). Mittlerweile ist bekannt, dass der SCF-Komplex auch in ERAD involviert sein kann. So zeigten Yoshida *et al.*, 2002 einen leichten Einfluss dieses SCF-Komplexes mit dem F-Box-Protein Fbx2 auf den Abbau von N-gekoppelten Mannose-reichen Oligosacchariden wie CFTR in Säugerzellen.

Unser Wissen um diese Ubiquitinierungs-Komplexe beruht vor allem auf Ergebnissen aus der Forschung an Hefezellen. Die bestcharakterisierten E2-Enzyme sind das membranständige Ubc6p (Sommer and Jentsch, 1993) und das lösliche, über Cue1p an die ER-Membran gekoppelte Ubc7p (Hiller *et al.*, 1996; Biederer *et al.*, 1997). Weitere E2s sind Ubc1p (Friedländer *et al.*, 2000), Ubc4p und Ubc5p (Seufert and Jentsch, 1990; Chen *et al.*, 1993). In den meisten Fällen kooperieren Ubc7p und Ubc1p oder Ubc6p mit dem Ring-H2 Finger Domänen E3-Enzym Hrd1p/Der3p (Bays *et al.*, 2001b; Deak and Wolf, 2001). Hrd1p/Der3p ist für die Ubiquitinierung von sowohl manchen löslichen (CPY\*) als auch verschiedenen Transmembranproteinen wie Pdr5\*<sup>p</sup> und HMG-CoA Reduktase notwendig. Die Aktivität dieses Proteins ist abhängig von der Anwesenheit des membranständigen Hrd3p (Hampton *et al.*, 1996), dessen Funktion noch ungeklärt ist, das aber eventuell der Signalübertragung über die ER-Membran dient (Plemper *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 2000; Deak and Wolf, 2001). Ein weiteres bekanntes E3-Enzym der ER-Membran ist DOA10/Ssm4p (Swanson *et al.*, 2001). Gezeigt wurde sein Einfluss auf die Ubiquitinierung der Deg1-Domäne des Transkriptionsrepressors MAT $\alpha$ 2 und auf den Abbau des E2-Enzyms Ubc6p. Die analogen E2-Enzyme für die Ubiquitinierung falsch gefalteter ER-Proteine in Säugerzellen sind MmUbc6 und MmUbc7 (Tiwari and Weissman, 2001) und das Ringfinger-E3-Enzym gp78 (Fang

*et al.*, 2001). gp78 rekrutiert MmUbc7 an die ER-Membran und wird daher als analog zu Cue1p in der Hefe angesehen (Fang *et al.*, 2001).

Für den Abbau von Proteinen besitzen Eukaryoten zwei verschiedene Wege. Einen endozytotisch-lysosomalen, bei der Hefe vakuolären und einen ATP-abhängigen nicht lysosomalen Weg. Ersterer dient vor allem der Rückgewinnung von Aminosäuren bzw. der Energiegewinnung in Hungerphasen. Zu den wichtigsten proteolytischen Enzymen der Hefe-Vakuole gehören die Proteinase A (Pep4p), Proteinase B (Prb1p) und die Carboxypeptidasen Y (CPY / Pre1p) und S (Cps1p / Van Den Hazel *et al.*, 1996; Rendueles and Wolf, 1988).

Im Gegensatz dazu hat sich das Proteasom als die regulatorische, proteolytische Maschinerie der Eukaryotenzelle herausgestellt. Rechsteiner und Kollegen identifizierten 1986 einen Proteasekomplex, der in der Lage war, *in vitro* ubiquitinierte Proteine abzubauen (Hough *et al.*, 1986). 1991 zeigten Heinemeyer *et al.*, 1991, dass das Proteasom *in vivo* die Maschinerie ist, welche in der Zelle ubiquitinierte Proteine abbaut. Damit war erstmals die Ubiquitinierung von Proteinen mit der proteasomalen Proteolysemaschinerie verbunden. Nach dieser Entdeckung wurde schnell klar, dass das dann sogenannte Ubiquitin-Proteasom-System an der Regulation einer Vielzahl von zentralen zellulären Prozessen beteiligt ist, wie der Regulation des Zellzyklus, Mechanismen der Immunantwort, der Prozessierung von Proteinen oder eben der ER-assoziierten Degradation. Das Proteasom ist ein großer 26S-Multiproteinkomplex bestehend aus einem 20S-Kernpartikel und zwei an den Enden aufsitzenden 19S *cap* Einheiten, den regulatorischen Partikeln (zusammen etwa 1700kDa), der bei Eukaryoten in Zytoplasma und Kern lokalisiert ist. Die Bezeichnungen 19S, 20S und 26S beziehen sich auf die Sedimentationskonstanten der Partikel in der Einheit Svedberg. In seiner Gesamtheit entspricht das Proteasom einer Art Tonne mit regulierbaren Öffnungen und einer inneren Kammer im 20S-Kern, welcher die proteolytischen Aktivitäten birgt und von der Umwelt abschirmt. Dieser Kern besteht wiederum aus vier aufeinandergesetzten Ringen mit je 7 verschiedenen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten mit der Struktur  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ . Alle Untereinheiten des Eukaryotenproteasoms sind wichtig für die Funktionalität des Gesamtkomplexes. Das Fehlen einer Untereinheit ist sogar letal für die Zellen. Drei der  $\beta$ -Untereinheiten sind proteolytisch aktiv. Hierbei unterscheidet man eine Trypsin-ähnliche (Pup1p), eine chymotrypsin-ähnliche (Pre2p) und eine peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolysierende (PGPH, Pre3p)-ähnliche Aktivität (Groll *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998; Gerards *et al.*, 1998; Groll *et al.*, 1999). Die N-terminalen Peptidanhänge der  $\alpha$ -Untereinheiten kontrollieren als eine Art Pforte den Eintritt in diese Kammer und werden von Pre9 ( $\alpha_3$ ) koordiniert (Groll *et al.*, 2000). Die 19S-Einheiten sind für die Erkennung, Bindung, Entfaltung und Einführung abzubauenender polyubiquitiniertes Proteine nötig. Sie bestehen aus je einer *base*- und einer *lid*-Einheit. Die *base* besteht aus sechs ATPasen der AAA-Familie (Rpt1-6), die auf dem  $\alpha$ -Ring des 20S aufsitzen und drei Nicht-ATPasen (Rpn1,2 und 10). Der *lid* besteht aus acht Untereinheiten. Zu seinen Funktionen zählt die Abspaltung der Polyubiquitinketten von abzubauenenden Proteinen. Kann die Poly-Ub-Kette nicht vom Substrat abgespalten werden, scheint dieses im Proteasom stecken zu bleiben und es

zu blockieren (Verma *et al.*, 2002; Yao and Cohen, 2002). Demnach gelangen Ubiquitinreste nicht in das Proteasom. Auch die Zuckerreste von glykosylierten Proteinen werden vor dem Abbau abgeschnitten. In Hefe übernimmt diese Aufgabe die lösliche N-Glykanase (Png1p). Auch wenn das Protein nicht essentiell ist, so wird es dennoch für den effizienten Abbau von CPY\* benötigt (Suzuki *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass Png1p über Rad23 an das Proteasom gekoppelt wird, um dort Zuckerreste von abzubauen Glykoproteinen abzuschneiden (Suzuki *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit verwendeten Substrate CFTR (Mensch), Pdr5\*p und CPY\* (Hefe) werden alle über das Ub-abhängige Proteasom-System abgebaut (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995; Kiser *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001 / Plemper *et al.*, 1998 / Finger *et al.*, 1993; Hiller *et al.*, 1996). Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist noch immer weitgehend unbekannt.

## Medizinische Relevanz von ERAD

Verschiedene ERAD-Substrate des Menschen stehen in unmittelbarer Verbindung zu schweren, meist erblichen Krankheiten, viralen Infektionen oder Vergiftungen durch bakterielle Toxine. Neben der bereits beschriebenen Mukoviszidose hängt auch die neurodegenerative Parkinson-Krankheit eng mit ERAD zusammen. In einem bisher untersuchten Fall ist das Protein *Parkin* mutiert, eine E3-Ubiquitin-Ligase, die unter anderem am Abbau des membrangebundenen Pael-Rezeptors beteiligt ist (Kitada *et al.*, 1998). Bei Ausfall des *Parkin* wird der Pael-Rezeptor nicht mehr abgebaut und aggregiert in den betroffenen Nerven-Zellen. Sie sterben ab (Imai *et al.*, 2001). Auch die Alzheimer-Krankheit, die spongiforme Enzephalopathie, Wilson-Krankheit und Lungen-Emphysem hängen mit ERAD zusammen (Kostova and Wolf, 2002; Rutishauser and Spiess, 2002).

Einige humanpathogene Viren wie die Zytomegaloviren (Shamu *et al.*, 1999; Wiertz *et al.*, 1996) und HIV-1 (Margottin *et al.*, 1998) nutzen ERAD, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen (Ploegh, 1998), indem sie den Abbau zelleigener Proteine induzieren, die für die Immunreaktion notwendig sind.

Bakterielle Giftstoffe wie das Cholera- oder das Shiga-Toxin gelangen über Endozytose und retrograden Transport in das ER (Falnes and Sandvig, 2000). Von dort können sie ihren eigenen Transport über das Translokon ins Zytosol induzieren, um dort ihre gefährliche/tödliche Wirkung zu entfalten (Simpson *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000). Die genaue Kenntnis der Mechanismen rund um ERAD ist somit von breiter Relevanz in Hinsicht auf mögliche medizinische Ansätze für Therapien zur Behandelbarkeit schwerster Krankheitsbilder.



## Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Faktoren, die an der Qualitätskontrolle und dem folgenden Abbau des humanen Transmembranproteins CFTR beteiligt sind. Sie sollte damit im Rahmen der Grundlagenforschung dazu beitragen, die molekularbiologischen Abläufe von Qualitätskontrolle und Proteinabbau bezüglich medizinisch relevanter humaner Transmembranproteine, insbesondere CFTR, weiter aufzuklären.

Hierfür sollte CFTR heterolog in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Die Mechanismen der Qualitätskontrolle und des ERAD sind in der Hefe am besten charakterisiert und viele Mutanten für die Untersuchung dieser beiden Prozesse sind in Hefe bereits verfügbar, bzw. leicht zu generieren. Vergleichende Experimente mit dem mutierten Hefe-CFTR-Ortholog Pdr5\*<sub>p</sub> sollten zeigen, ob und inwiefern die Hefe in den Prozessen der Qualitätskontrolle und des ERAD zwischen eigenen und heterolog exprimierten Transmembranproteinen unterscheidet. Die Prozesse der Qualitätskontrolle und des ERAD besitzen von der Hefe bis zum Säuger eine hohe evolutive Konserviertheit, die in vielen Fällen die in der Hefe gewonnenen Ergebnisse direkt auf die Säugerzelle übertragbar machen sollte.

# Material und Methoden

## Material

### Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BY $\Delta$ htm1	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0/ MET15; LYS2/lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0 YHR204w::<i>kanMX4</i>/YHR204w::<i>kanMX4</i></i>	EUROSCARF, Frankfurt / Main
BY $\Delta$ mns1	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0/ MET15; LYS2/lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0 YJR131w::<i>kanMX4</i>/YJR131w::<i>kanMX4</i></i>	EUROSCARF, Frankfurt / Main
GKY 356	<i>PDR1-3-LEU2 leu2 ura3 [PDR5- human WT CFTR- URA3]</i>	Kiser <i>et al.</i> , 2001
GKY 360	<i>PDR1-3-HIS3 his3 leu2 ura3 ubc6<math>\Delta</math>/ubc7<math>\Delta</math>::LEU2 [PDR5- human WT CFTR-URA3]</i>	„
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3, 112 his3-11, 15 can1-100</i>	Chiang and Schekman, 1991
W303	W303-1B [ <i>PDR5-human WT CFTR-URA3</i> ]	diese Arbeit
WTCF		
W303	W303-1B [ <i>PDR5-human <math>\Delta</math>F508 CFTR-URA3</i> ]	diese Arbeit
$\Delta$ CF		
YAG 58	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-LEU2 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 [PDR5-human WT CFTR-URA3]</i>	diese Arbeit
YAG 59	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-LEU2 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 <math>\Delta</math>doa10::<i>HIS3</i> [PDR5-human WT CFTR-URA3]</i>	diese Arbeit
YAG 60	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-HIS3 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 [PDR5-human WT CFTR-URA3]</i>	diese Arbeit
YAG 61	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-HIS3 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 <math>\Delta</math>hrd1::<i>LEU2</i> [PDR5-human WT CFTR-URA3]</i>	diese Arbeit
YAG 97	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-TRP1 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 <math>\Delta</math>doa10::<i>HIS3</i> <math>\Delta</math>hrd1::<i>LEU2</i> [PDR5- human WT CFTR-URA3]</i>	diese Arbeit
YAG 123	YWO500 [ <i>PDR5-human WT CFTR-URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 124	YWO500 [ <i>PDR5-human <math>\Delta</math>F508 CFTR-URA3</i> ]	diese Arbeit

YAG 129	YWO500 $\Delta htm1::kanMX$ [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG142	W303 <i>MATa</i>	diese Arbeit
YAG 153	<i>PDR1-3-LEU2 ade2 ura3 trp1-1 leu2-3 his3-11</i> [PDR5- human CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 154	<i>PDR1-3-LEU2 ade2 ura3 trp1-1 leu2-3 lys2-801 cdc48- 1</i> [PDR5-human CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 159	<i>MATa PDR1-3-TRP1 ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3 leu2- 112 his3-11 can1-100</i> [PDR5-human CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 160	<i>MATa PDR1-3-TRP1 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3-<math>\Delta</math>200 lys2-801 <math>\Delta ubc1::HIS3 \Delta ubc7::LEU2</math></i> [PDR5- human CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 163	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-TRP1 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801</i> [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 164	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-TRP1 ura3-52 trp1-1 leu2-3 leu2-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 <math>\Delta hrd1::LEU2</math></i> [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 168	<i>MATa PDR1-3-HIS3 ade2-101 ura3-52 his3<math>\Delta</math>200 tyr1 <math>\Delta mns1::kanMX</math></i>	diese Arbeit
YAG 169	<i>MATa PDR1-3-HIS3 ade2-101 ura3-52 his3<math>\Delta</math>200 tyr1</i>	diese Arbeit
YAG 170	<i>MAT<math>\alpha</math> PDR1-3-HIS3 ade2-101 ura3-52 his3<math>\Delta</math>200 lys2- 801</i>	diese Arbeit
YAG 171	YWO500 $\Delta htm1::kanMX$ [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> / p413 TEF]	diese Arbeit
YAG 172	YWO500 $\Delta htm1::kanMX$ [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> / p413 TEF-mEDEM-HA]	diese Arbeit
YAG 173	YWO500 $\Delta htm1::kanMX$ [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> / p423 TEF]	diese Arbeit
YAG 174	YWO500 $\Delta htm1::kanMX$ [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> / p423 TEF-mEDEM-HA]	diese Arbeit
YAG 179	YWO 500 $\Delta mns1::kanMX$	diese Arbeit
YAG 180	W303 $\Delta prc1::LEU2 \Delta htm1::kanMX$ [pRS316- <i>prc1-1- URA3</i> / p413 TEF]	diese Arbeit
YAG 181	W303 $\Delta prc1::LEU2 \Delta htm1::kanMX$ [pRS316- <i>prc1-1- URA3</i> / p413 TEF-mEDEM-HA]	diese Arbeit
YAG 182	W303 $\Delta prc1::LEU2 \Delta htm1::kanMX$ [pRS316- <i>prc1-1- URA3</i> / p423 TEF]	diese Arbeit
YAG 183	W303 $\Delta prc1::LEU2 \Delta htm1::kanMX$ [pRS316- <i>prc1-1- URA3</i> / p423 TEF-mEDEM-HA]	diese Arbeit
YAG 184	<i>ade2 ura3 trp1-1 leu2-3 his3-11 <math>\Delta pdr5::TRP1</math></i> [HA- <i>pdr5-26-LEU2</i> ]	diese Arbeit

YAG 185	<i>ade2 ura3 trp1-1 leu2-3 lys2-801 cdc48-1 Δpdr5::TRP1</i> [HA- <i>pdr5-26-LEU2</i> ]	diese Arbeit
YAG 188	<i>MATa ade1-100 ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519</i> <i>Δpdr5::hisG</i> [HA- <i>pdr5-26-LEU2</i> ]	diese Arbeit
YAG 189	<i>MATa ade1-100 ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519</i> <i>ufd1-1 Δpdr5::hisG</i> [HA- <i>pdr5-26-LEU2</i> ]	diese Arbeit
YAG 192	<i>MATa PDR1-3-LEU2 ade1-100 ura3-52 leu2-3 leu2-112</i> <i>his4-519 Δpdr5::hisG</i> [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 193	<i>MATa PDR1-3-LEU2 ade1-100 ura3-52 leu2-3 leu2-112</i> <i>his4-519 ufd1-1 Δpdr5::hisG</i> [PDR5-human WT CFTR- <i>URA3</i> ]	diese Arbeit
YAG 198	YWO500 <i>Δhtm1::kanMX</i> [HA- <i>pdr5-26-LEU2</i> / p423 TEF]	diese Arbeit
YAG 199	YWO500 <i>Δhtm1::kanMX</i> [HA- <i>pdr5-26-LEU2</i> / p423 TEF-mEDEM-HA]	diese Arbeit
YR312 (17/14)	<i>MATa his1-123</i>	G.R. Fink-Lab
YR320 (17/17)	<i>MATα his1-123</i>	G.R. Fink-Lab
YWO 500	<i>MATa PDR1-3 ura3-1 trp1-1 leu2-3, 112 his 3-11, 15</i>	Mahé <i>et al.</i> , 1996

## Escherichia coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL 21	<i>siehe E. coli B, F-, ompT, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm</i>	Amersahm- Pharmacia Biotech
DH5α	<i>supE44 Δlac U169 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA69 thi-1 relA1</i>	Hanahan 1983
XL1-Blue	<i>F'::Tn10 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/recA1 endA1</i> <i>gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac</i>	Stratagene

## Plasmide

Plasmid	Insertion	Referenz
pAGC 3 (pGK118)	pKV 2 / <i>PDR5</i> -human WT CFTR- <i>URA3</i>	Kiser <i>et al.</i> , 2001 (pKV 2 aus Katzmann <i>et al.</i> , 1994)
pAGC 4 (pGK119)	pKV 2 / <i>PDR5</i> -human $\Delta$ F508 CFTR- <i>URA3</i>	„
pAGC 5 (pGK 121)	pRS403 / <i>PDR1-3-HIS3</i>	„
pAGC 6 (pGK122)	pRS405 / <i>PDR1-3-LEU2</i>	„
pAGC 10 (pYM31)	pBS / $\Delta$ <i>pr5::hisG-URA3-</i> <i>hisG</i>	Mahe <i>et al.</i> , 1996
pAGC 19	YEplac181 / $\Delta$ <i>pr5::TRP1</i>	Bissinger and Kuchler, 1994
pAGC 28	pRS304 / <i>PDR1-3-TRP1</i>	diese Arbeit
pAGC 29 (pCT42)	pRS316 / <i>GDP-prc1-1-HA<sub>3</sub>-</i> <i>URA3</i>	C. Taxis
pAGC 36	p413 TEF	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
pAGC 38	p423 TEF	„
pAGC 47	pCMV-SPORT2 / mEDEM- HA	Hosokawa <i>et al.</i> , 2001
pAGC 52 (pCKSF1-26)	pRS 315 / HA- <i>pr5-26-LEU2</i>	„
pAGC 54	p413 TEF / mouse EDEM-HA	diese Arbeit
pAGC 55	p423 TEF / mouse EDEM-HA	diese Arbeit
pCP 50 (pGAL-HO)	pGAL-HO (MAT-Wechsel)	Hicks and Herskowitz, 1976
pCT 40	pRS316 / <i>prc1-1-HA<sub>3</sub>-URA3</i>	C. Taxis

## Primer

Primer	Sequenz 5' ® 3'	Verwendung
CFTR.uni	atgcagaggctgcctctgg	Sequenzierung von Gesamt- CFTR
CFTR.rev	gtgtcctcaattccccttacc	„
CFTR-Test.uni	gttgattctgctgacaatctatctg	CFTR-Test-PCR aus Hefe

CFTR-Test.rev	gaggatgattcctttgattagtgc	”
5' HTM1	gcggtaggataatctccttgacgg	Deletionsfragment für HTM1
3' HTM1	gcgaccagcgaaatggatgagctg	”
Δhtm1 frw	ggcatctagagtgatgacg	Test der Deletion von Htm1 mit 3'kan
Δhtm1 rws	tttaccctaggaatatcg	” mit 5'kan
kan	ctgcgccggttcattcg	
3'kan	gaggcataaattccgtcagcc	Deletion von Htm1
5'kan	cgagtcggaatcgagaccg	”
5' HTM1	gcggtaggataatctcct tgacgg	Deletionskassette für HTM1
3' HTM1	gcgaccagcgaaatggatgagctg	”
mEDEM-SpeI_ for	gactagtagcaatggcgcgagcgttgc	Umklonierung von mEDEM- HA
mEDEM-XhoI_ rev	ccgctcgagtcaggcgtagtcaggcacgctc	Umklonierung von mEDEM- HA
mEDEM.uni	tccccgggatgcaatggcgcgagcgttgcctgg	Umklonierung von mEDEM- HA
mEDEM.rev	ccatcgatcgatgcacgcgtaagcttca	”
mEDEMint-1_for	catcggccaaggcgcggaacg	Sequenzierung von mEDEM
mEDEMint-2_for	cagcaataatgagacctgcacagc	Sequenzierung von mEDEM
Δmns1_for	gtaacgcattttctgtggaagagc	MNS1-Deletion
Δmns1_rev	ccagacgaaaaatgattgattatgc	MNS1-Deletion
Δmns1-T_fo	gaagttaattgagttcttaaaccgc	Überprüfen der MNS1- Deletion mit kanMX-Primern
Δmns1-T_re	gcattagttcttacggcagcg	Überprüfen der MNS1- Deletion mit kanMX-Primern
pTEF-Prom.uni (2. Versuch)	ctaagttttctagaactagtgatcccc	”
PCYC1-Term.rev	agggcgtgaatgtaagcgtgacataac	”

## Antikörper

Anti-Hase HRPO	Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
Anti-Maus HRPO	Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
Hase Anti-Pdr5p (αN-1)	Plemper <i>et al.</i> , 1998
Maus Anti-CFTR (C-Terminus)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Maus Anti-CFTR (M3A7)	J.R. Riordan, Mayo Clinic Scottsdale, Scottsdale, Arizona, USA
Maus Anti-CPY	Dianova, Hamburg
Maus Anti-HA	Babco/Covance, Berkeley, CA, USA - über Hiss Diagnostics

## Kits

DNA Gelextraktion	Quick DNS Gelextraction Kit, Quiagen, Hilden
ECL-Detection Kit	Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
Mini-Preps	Wizard™ <i>Plus</i> Minipreps DNA Purification Systems, Promega, Madison, Wisconsin, USA; Qiagen, Hilden; PeqLab, Erlangen
Midi- / Maxi-Preps	Qiagen, Hilden
PCR-Produkt Reinigung	PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden

## Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	NEB, Beverly, USA
<i>Dap</i> Goldstar-DNS-Polymerase	Eurogentec, Seraing, Belgien
Deep Vent-DNS-Polymerase	NEB, Beverly, USA
Glusulase	Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA
Oxalyticase	Enzogenetics, Corvallis, OR, USA
RNase A	Sigma, Deisenhofen
RNase H	Sigma, Deisenhofen
T4-DNS-Ligase	NEB, Beverly, USA; Boehringer/Roche, Mannheim; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe; Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
Taq-DNS-Polymerase	Boehringer/Roche, Mannheim; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Zymolyase 100-T	Seikagaku Corp., Japan – über Medac, Wedel

Restriktionsenzyme wurden von NEB, Beverly, USA und Boehringer/Roche, Mannheim bezogen.

## Chemikalien und Gebrauchsmaterial

Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Roth, Karlsruhe; Sigma, Deisenhofen
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
Chymostatin	Sigma, Deisenhofen
Complete™ Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DTT	Roth, Karlsruhe
ECL™ Chemilumineszenz-Filme	Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
5-FOA	Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Kanada
G418	Sigma, Deisenhofen
Gel-Blotting-Papier GB 001-003	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasperlen	B. Braun Biotech, Melsungen
Hefemedien	Difco, Michigan, USA (zu Beckton Dickinson)
Längenstandards	NEB, Beverly, USA; BioRad, Hercules, USA; Roche, Mannheim
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Dr. Groß, Sauerlach
Nitrocellulose-Membranen	Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA
Biotrace™ NT 0,45µm	
Oligonukleotide	Sigma-ARK, Darmstadt; MWG Biotech, München
Pefabloc	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Protein A-Sepharose CL-4B	Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
Protein G Plus/ProteinA	Calbiochem-Oncogene zu Merck, Darmstadt
Agarose	
Protogel 30%	Kimberly Research, Atlanta, USA
PVDF-Immun-Blot™ - Membranen	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Radiochemikalien	ICN Biomedicals, Aurora, USA; Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
<sup>35</sup> S-sensit. Filme (BioMax)	Kodak, über Sigma, Deisenhofen



<sup>35</sup> S-sensit.	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Quantifizierungsmembranen	
Streptavidin	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen

Alle weiteren Chemikalien wurden von den üblichen Herstellern nach Bedarf bezogen.

## Geräte

Großschüttler	Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz
Elektroporator	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Filmentwickler Optimax	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
Gelkammern für DNA und Protein-Wet-Blot	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Inkubatoren	Heraeus, über Kendro, Hanau
Kühlschrank / -truhe (-80°C)	Heraeus, über Kendro, Hanau
Kühlzentrifuge Centrikon T-124	Kontron, Neufarn/München
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, über Kendro, Hanau
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikromanipulator	Rainin Instruments Co. Inc., Leiden, NL
PH-Messung	Fisher Scientific GmbH, Schwerte; Knick, Berlin; Schott, Mainz
Phospho Imager	Molecular Probes Inc., Eugene, USA
Photodokumentation DNA-Gele	MWG Biotech, München; Mitsubishi, Japan
Semi Dry Blotting-Apparaturen	ITF Labortechnik, Wasserburg; LTF / Fröbel, Wasserburg
Spektrophotometer	Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB; Jasco, Tokyo, Japan
Thermocycler	Biometra, Göttingen; Stratagene, La Jolla, CA, USA; Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge	Beckmann Inc., Palo Alto, CA, USA

UV-Schirm

Fisher Scientific GmbH, Schwerte; Konrad

Vakuumgetrockner

Benda – über MS Laborgeräte, Wiesloch  
Fröbel Laborgeräte, Wasserburg

Zentrifugen für Tisch und Boden

Heraeus, über Kendro, Hanau

## Methoden

### Kultivierung der Modellorganismen

Hefen wurden entweder auf Kulturplatten oder in Flüssigmedium angezogen. Je nach Bedarf wurde YPD-Vollmedium oder SCD / CM-Mangelmedium mit gewünschtem Aminosäuremangel verwendet. Deletionsstämme, deren Gensequenzen durch eine kanMX-Kassette (Wach *et al.*, 1994) ersetzt wurde, wuchsen auf YPD-Medium mit 200µg/mL G418. Die Inkubationstemperaturen schwankten je nach Versuch zwischen 18°C, 20°C, 23°C, 25°C, 30°C und 37°C. Dauerkulturen wurden in 15% Glycerin bei -80°C gelagert.

*Escherichia coli* wurde auf LB-Medium, flüssig oder als Kulturplatten, bei Bedarf mit entsprechenden Antibiotika (50µg/mL Ampicillin, 20µg/mL Chloramphenicol, 12µg/mL Tetracyclin) supplementiert bei 37°C angezogen. Zellen, die einen Ligationsvektor mit β-Galaktosidase und einer inserierten Gensequenz trugen, konnten nach Ligations-Transformationen auf AXI-Platten (20µg/mL X-Gal; 0,1mM IPTG) über die sog. Blau-Weiß-Selektion auf Plasmide mit Insertion getestet werden, da solche Kolonien weiß blieben, während solche mit Vektor aber ohne Insertion auf diesen Platten blaue Kolonien bildeten. Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde neben LB SOB-Medium verwendet. Nach Transformationen wurden die Zellen in SOC-Medium inkubiert (siehe dort). Dauerkulturen wurden in 30% Glycerin aufgenommen und bei -80°C gelagert.

### Bearbeitung der Modellorganismen

#### *Hefe*

##### *Hefe-Transformation*

Standardmethode für Plasmidtransformationen war die Litium-Acetat-Methode nach Soni *et al.*, 1993. Als Vorlage für die Transformation von Genbanken diente das Protokoll von Schiestl und Gietz, 1989.

##### *Zellzählung*

Zur Auszählung von Hefezellen in Flüssigkultur wurde eine Neubauer-Kammer (Brand, Wertheim) verwendet.

### *Paarungstypwechsel von zu kreuzenden Hefestämmen*

Der Paarungstypwechsel von haploiden Hefezellen wurde über die Expression der HO-Endonuklease wie in Hicks and Herskowitz, 1976 induziert. Die HO-Endonuklease war auf dem Plasmid pCP50-GalHO kodiert, welches in Hefe über CM-ura Medium selektionierbar war und die Expression der HO-Endonuklease über einen induzierbaren Galaktose-Promoter ermöglichte.

### *Paarungstypetest*

Der Paarungstyp von Hefestämmen konnte mit Teststämmen überprüft werden. Die Teststämme YR312 (Paarungstyp a) und YR320 (Paarungstyp  $\alpha$ ) trugen als einzige Auxotrophie-Marke eine *his1-123*-Mutation, die nur in Verbindung mit durch Paarung erlangte Standard-Mutationen wie *his3* aus den zu testenden Stämmen Wachstum auf MV-Platten ohne Aminosäuren erlaubte. Nur die Paarung des zu testenden Stammes mit dem Kontrollstamm des entgegengesetzten Paarungstyps ermöglichte daher Wachstum und zeigte so auch den Paarungstyp des gesuchten Stammes an. Wuchs ein Stamm mit keinem der Testerstäme an, handelte es sich um eine diploide Zelle.

### *Mutation über Kreuzung zum Erhalt von CDC48/*cdc48-1*-Stämmen mit benötigten Auxotrophiemarkern*

Dem Hefestamm *cdc48-1* (Kälte-sensitiv -  $c_s$ ) fehlten für die geplanten Versuche notwendige Auxotrophie-Marker. Zur Kreuzung wurden die haploiden Stämme W303-1B (*MAT $\alpha$* ) und *cdc48-1* (*MATa*) auf YPD vermischt angezogen und auf Selektionsmedium gegen Negativkontrollen (haploide zu kreuzende Stämme) auf Paarung (=Wachstum) getestet. Gepaarte Klone wurden auf passende Selektionsplatten ausgestrichen und  $\bar{u}N$  bis zu zwei Tagen bei 25-30°C angezogen. Diese wurden in 2mL KAc-Medium (1% KAc; 0,1% Bacto-Hefe-Extrakt; 0,05% Glukose) 1 Woche bei RT unter Schütteln inkubiert, um die Tetradenbildung zu induzieren. Sobald genügend Tetraden vorlagen, wurden diese nach Zentrifugation bei 2000rpm, für 2min in sterile Eppendorfgefäße überführt und zwei mal mit Aq dest gewaschen. Anschließend wurden sie in 200 $\mu$ L Aq dest resuspendiert und mit 3 $\mu$ L Glusulase<sup>□</sup> (Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA) 3min bei RT inkubiert, um den Sporencus aufzulösen. Durch Zugabe von 800 $\mu$ L Aq dest konnte die Glusulase auf "Inaktivität" verdünnt werden. Dann wurden die Sporen mind. 1h bis  $\bar{u}N$  bei 4°C quellen gelassen, ca. 10 $\mu$ L der Suspension auf eine plane, dünne YPD-Platte aufgetropft und in einer Linie über die Platte verteilt. Die Tetraden wurden dann mit einem Micromanipulator (Rainin Instruments Co.) vereinzelt und in einem Abstand von ca. 4mm auf der Platte verteilt. Nach etwa 2 Tage bei 25-30°C wuchsen die Sporen zu aktiven Hefeklonen heran, die über Selektionsplatten auf ihre Auxotrophien und bei verschiedenen Temperaturen (18°C; 23°C; 25°C) auf den  $c_s$ -Genotyp von *cdc48-1* getestet wurden.

### *Deletion über PCR-synthetisierte Deletionskassetten nach Longtine et al., 1998*

Die Gene HTM1 und MNS1 wurden über PCR-Fragmente einer Kanamycin (kanMX4)-Kassette (Wach *et al.*, 1994) mit jeweils zu den Genen homologen flankierenden Sequenzen über homologe Rekombination (Ma *et al.*, 1987; Orr-Weaver *et al.*, 1981; Orr-Weaver and Szostak, 1983) in den Hefezellen deletiert. Hierzu wurden Primer etwa 100bp bis 400bp up- und downstream der Kanamycin-Kassette innerhalb des zu deletierenden Gens synthetisiert und diese Fragmente über PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind der Primer-Liste zu entnehmen. Als Matrize diente genomische DNS der entsprechenden Hefestämme aus der EUROSCARF-Deletionsgenbank (Frankfurt / Main). Für die PCR-Synthese wurde VENT-Polymerase (NEB, Beverly, USA) mit Fehlerkorrektur-Funktion verwendet. Mehrere Ansätze wurden aus einem Agarose-Gel isoliert, vereinigt, gefällt und in 15µL Aq. bid. resuspendiert. Etwa 1µg PCR-DNA wurde nach Standardmethode (Soni *et al.*, 1993) in 10mL Hefezellen mit einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 transformiert. Der Ansatz wurde dann zunächst für 4h bei 30°C in YPD-Flüssigmedium inkubiert und anschließend auf YPD-G418 [200µg/mL] Platten verteilt. Als Negativkontrolle dienten nicht transformierte Zellen des gleichen Stammes. Einzelkolonien wurden weitere zwei mal auf Einzelkolonien ausgestrichen. Solche, die auf YPD-G418-Platten gut wuchsen, wurden mittels PCR auf korrekte Insertion in das Genom und Verschwinden des WT-Gens getestet (Primer siehe Primer-Liste).

### *Mutationen / Deletionen über integrative Vektoren*

Die Funktions-verstärkende Mutation *PDR1-3* hebt die Aktivität des Transkriptionsfaktors Pdr1p an und erhöht dadurch u.a. die Expression der Gene, die unter dem PDR5-Promoter stehen. Das ist in der Hefe der ABC-Transporter Pdr5p und in unserem System auch das heterolog exprimierte humane CFTR. *pdr1-3* wurde in integrative Vektoren mit den Selektionsmarken TRP1 (pRS 304), LEU2 (pRS 305) und HIS3 (pRS 303) kloniert, über die Enzyme *NsiI*, *NsiI* und *HpaI* respektiv linearisiert und in Hefe transformiert. Die Integration in das Hefegenom konnte über neu gewonnene Aminosäure-Prototrophien und über gesteigerte Resistenz gegen CHX (siehe CHX-Resistenztest) getestet werden.

### *Deletionen über homologe Rekombination*

Das WT-Gen PDR5 in den Stämmen *CDC48 / cdc48-1* und *UFD1 / ufd1-1* wurde über homologe Rekombination deletiert. Hierfür wurden folgende Plasmid-Konstrukte verwendet:  $\Delta pdr5::TRP1$  (Mahé *et al.*, 1996) für die Stämme *CDC48 / cdc48-1*;  $\Delta pdr5::hisG-URA3-hisG$  (Bissinger and Kuchler, 1994) für die Stämme *UFD1 / ufd1-1*.  $\Delta pdr5::TRP1$  wurde vor der Transformation über *EcoR* I und *Hind* II und  $\Delta pdr5::hisG-URA3-hisG$  über *Sal* I und *Xba* I aus den jeweiligen Vektoren

geschnitten. Die Rekombination mit dem *PDR5*-Gen konnte auf entsprechenden Selektionsmedien getestet werden. Das Konstrukt  $\Delta pdr5::hisG-URA3-hisG$  bietet die Möglichkeit des Verlustes von *URA3* durch interne homologe Rekombination der *hisG*-Fragmente in YPD-Medium („PopOut“). Hierfür wurden die Zellen zunächst in YPD-Medium inkubiert und anschließend auf MV-Platten mit 2xUracil und 1mg/mL 5FOA (5-Fluoro-Uracil) verteilt. Nur Uracil-auxotrophe Zellen können auf diesem Medium wachsen. Einzelkolonien wurden nochmals ausgestrichen und danach nochmals auf CM-ura auf den Verlust getestet. In beiden Fällen wurde die Deletion in Western-Blots mit Pdr5- $\alpha$ N1-Antikörpern gegen Pdr5p (Plemper *et al.*, 1998) verifiziert. Weiterhin konnte Funktion/Dysfunktion des Proteins Pdr5p über den CHX-Resistenz-Test nachgewiesen werden.

#### *CHX-Resistenz-Test*

Um die gesteigerte Resistenz von Hefezellen zu testen, die eine PDR1-3-Mutation tragen, wurde eine Stammlösung von CHX [10mg/mL in EtOH] in flüssigen YPD-Agar von etwa 52°C gegeben. Die verwendeten Endkonzentrationen waren 0; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 bzw. 5  $\mu$ g/mL CHX. Die Mengen richteten sich nach den Ergebnissen von Carvajal *et al.*, 1997. Die Medien wurden in Petrischalen gegossen, getrocknet und bei 4°C gelagert. Für den Test wurden Zellen bis zu einer  $OD_{600}$  von 1 angezogen, in TE-Puffer gewaschen und 1  $OD_{600}$  in 1mL TE-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 1:100 und 1:1.000 in TE verdünnt und von den beiden Verdünnungen je 3  $\mu$ L auf die CHX-Testplatten getropft. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen, die eine höhere Resistenz im Vergleich zu den WT-Zellen zeigten, wurden für weitere Versuche verwendet. Die Deletion des PDR5-Gens verursacht eine erhöhte Sensitivität gegenüber CHX. Dies lässt sich in umgekehrter Weise zum eben beschriebenen Verfahren testen.  $\Delta pdr5$ -Stämme können unter CHX-Einfluss im Vergleich zu WT-Stämmen bereits bei geringeren Konzentrationen nicht mehr wachsen. Die hier verwendeten CHX-Konzentrationen waren 0; 0,1; 0,25 und 0,5  $\mu$ g/mL entsprechend der Ergebnisse von Bissinger und Kuchler, 1994.

#### *Expression von humanem WT und $\Delta F508$ CFTR in Hefe*

Das CFTR-Gen stand unter der Kontrolle von Promotor und Terminator des PDR5-Gens. Diese Kassetten war in einen Zentromer-Vektor (1 Kopie / Zelle) für Expression in Hefezellen kloniert (Kiser *et al.*, 2001). Um detektierbare Mengen des Proteins zu erhalten, wurde zusätzlich eine PDR1-3-Mutation in das Genom eingebaut (Kiser *et al.*, 2001 / diese Arbeit). Das CFTR-Plasmid wurde über Standard-Methoden in die Hefezellen transformiert. Die gelungene Transformation wurde mittels Prototrophie-Test und PCR, die Expression über Western und/oder IP überprüft. Als Antikörper wurden M3A7-Antikörper von J.R. Riordan (Kartner *et al.*, 1991) verwendet.

*Temperaturabhängigkeiten*

Zur Optimierung der Expression von CFTR wurden entsprechende Zellen bei verschiedenen Temperaturen zwischen 25°C und 37°C in Flüssigmedium inkubiert und anschließend einer IP (siehe dort) unterzogen.

*Expression von HA-pdr5-26 (pdr5\*) in Hefe*

HA-pdr5\* (Bissinger and Kuchler, 1994; Egner *et al.*, 1998) wurde in einem Zentromer-Plasmid mittels Standardtransformation in die Hefezellen eingebracht. Die Expression wurde über Western und/oder IP mit Antikörpern gegen das N-terminale HA-Immunepitop (Babco/Covance, Berkeley, USA) überprüft.

*Expression von prc1-1 (CPY\*) in Hefe*

Zwei Konstrukte wurden verwendet. Beide auf Zentromer-Vektoren. Die Tests der *UFD1-/ufd1-1*-Stämme erfolgten mit *prc1-1*-HA unter Kontrolle des GPD-Promotors, der Nachweis im CHX-Chase über antiHA-Antikörper (Babco/Covance, Berkeley, USA). Für die Versuche mit CPY\* in *Δhtm1*-Zellen unter mEDEM-Einfluss stand CPY\* unter der Kontrolle des eigenen Promotors. Hier wurde die Expression vor dem Versuch in Medium mit nur 0,1% Glukose induziert. CPY-Antikörper wurden von Molecular Probes, Eugene, OR, USA bezogen.

*Bakterien**Kompetente E. coli-Zellen für die Transformation von Plasmid-DNA**Elektrokompetente E. colis*

Die Zellen wurden von LB-Platten über Nacht in 2x5mL LB- oder SOB-Flüssigmedium bei 37°C auf einem Kulturschüttler angezogen. Am nächsten Morgen wurden sie in 500mL SOB (1L: 20g Trypton, 5g Yeast Extract, 0,5g NaCl lösen / 10mL 250mM KCl / pH7 / nach autoklavieren 5mL steriles 2M MgCl<sub>2</sub>) auf etwa OD<sub>600</sub>=0,1 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5-0,6 bei 37°C geschüttelt. Die Kulturen wurden in 50mL Falcon-Gefäße überführt und 30min auf Eis inkubiert. In drei Schritten aus Waschen mit schrittweise reduzierten Volumina eiskalten sterilen Wassers und Sedimentation über Zentrifugationen bei 3.500rpm für 6-15min wurden alle Zellen in ein Falcon-Gefäß vereinigt und in 20mL 10% Glycerin resuspendiert. Nach einer weiteren Sedimentation

wurden die Zellen in 1mL 10% Glycerin resuspendiert und á 80µL in Eppendorf-ReaktionsgefäÙe aliquotiert und bei -80°C gelagert. Fakultativ können die Zellen auch in flüssigem Stickstoff zunächst schockgefroren werden, was die Effizienz der Zelltransformation zusätzlich erhöhen soll.

#### Hitzeschock-kompetente *E. coli*

Zellen wurden über Nacht bei 37°C in LB-Medium angezogen und in 50mL LB auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,1 verdünnt. Die Zellen wurden dann weiter inkubiert bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,7. Nach Sedimentation bei 3.000rpm und 4°C wurde einmal mit 15mL eiskaltem 100mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und abschließend die Zellen in 30mL eiskaltem TC-Puffer (75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris/HCl, pH 7,5) resuspendiert. Sie wurden für 30min auf Eis inkubiert, wieder bei 4°C sedimentiert, in 3mL eiskaltem TC aufgenommen und zu 100µL aliquotiert. Gelagert wurden die Zellen bei -80°C.

#### *Transformation von E. coli*

Zwei Methoden kamen zur Anwendung.

Bei der Elektroporation (Dower *et al.*, 1989) wurde 1µL (ca. 0,2-0,5µg) Plasmid-DNS über einen gesteuerten Elektroschock (2,1kV, 400Ω, 25µF) in die auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen eingebracht. Die verwendeten speziellen Küvetten mit einer Spaltbreite von 2mm zwischen den Polen wurden zuvor ebenfalls auf Eis vorgekühlt. Nach dem Elektroschock wurden die Bakterien sofort in 1mL SOC-Medium (SOB + 20mM Glucose) aufgenommen und 50min bei 37°C inkubiert, bevor sie auf das jeweilige Selektionsmedium ausgestrichen wurden.

Die *Heat Shock*-Transformation fand vor allem Anwendung bei Ligationsansätzen, da größere Mengen an DNS verwendet werden konnten.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, die Hälfte der Ligations-DNS zupipettiert (i.d.R. 7,5µL) und die Ansätze für weitere 30min auf Eis inkubiert. Dann wurden sie 2min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, 5min bei RT inkubiert, 1mL SOC-Medium zugegeben und diese Ansätze für 50min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde nach Reduktion des Volumens auf die jeweiligen Selektionsmedien ausgestrichen.



## Molekularbiologische Methoden

Die Standardprotokolle für Restriktionen, Ligationen und Agarosegelelektrophorese stammen, wenn nicht anders erwähnt, aus Sambrook *et al.*, 1989 und sind in der Folge kurz gehalten.

### *Plasmidpräparation aus E. coli-Zellen*

Verschiedene Methoden fanden für verschiedene Applikationen Anwendung. Für die grobe Überprüfung großer Mengen von Klonen diente der „*Quick & Dirty*“-Aufschluss. Einzelne Kolonien, etwa nach einer Ligations-Transformation wurden in kleinen Feldern auf einer neuen Selektionsplatte über Nacht angezogen (*gepatched*). Davon wurde eine Holzspatelspitze Zellen in Eppendorfgefäße geschmiert, mit 30µL STET-Puffer (5% Triton X-100; 10mM Tris pH 7,5-8; 1mM EDTA / hier zusätzlich Bromphenolblau und 8% Sucrose) überschichtet und zum resuspendieren gevortext. Anschließend wurden 30µL eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (Roth, Karlsruhe) dazu pipettiert und die Ansätze 2 mal etwa 5 bis 10 Sekunden gevortext und anschließend 2min bei 13.000rpm abzentrifugiert. Der wässrige Überstand konnte dann direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und weiter ausgewertet werden. Für die saubere und schnelle Präparation von Plasmiden wurden die MiniPrep-Systeme von Promega, Madison, USA, Qiagen, Hilden und PeqLab, Erlangen verwendet. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit QIAfilter Plasmid Midi Kit oder Plasmid Maxi Kit, beide von Qiagen gewonnen.

### *Gewinnung von chromosomaler DNA aus Hefezellen*

Eine stationäre 3mL-Kultur wurde einmal mit Aq bid gewaschen und in 200µL Aufschluss-Puffer resuspendiert (10mM Tris/HCl pH8; 100mM NaCl; 1mM EDTA; 1% SDS; 2% Triton X-100). Nach Zugabe von 200µL Phenol-Chloroform und etwa 60µL Glasperlen wurden die Ansätze 3min bei 37°C gevortext. Nach Zugabe von 200µL Aq bid folgte eine Zentrifugation bei 13.000rpm für 5min bei 4°C. Der wässrige Überstand wurde mit 100% eiskaltem Ethanol so verستetzt, dass er eine Endkonzentration von 70% erhielt. Dieser Ansatz wurde für 5-10min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert und so die Nukleinsäuren sedimentiert. Diese wurden in 400µL TE-Puffer (pH8) aufgenommen und mit 30mg RNase versetzt. Nach einer 5min Inkubation bei 37°C konnte die RNA-freie chromosomale DNA über die im Folgenden beschriebene Fällung mit Ethanol gereinigt und konzentriert werden.

### *Fällung von DNS über Ethanol*

Die Fällung von DNS wurde vor allem für die Isolation und Konzentration von PCR- und/oder Restriktionsfragmenten verwendet. Zu den Ansätzen wurde 1/10 Volumen 3M NaAc (pH6,4) für Fragmente ab 100bp oder 1/10 Volumen 10M NH<sub>4</sub>Ac für kleinere Fragmente gegeben und

vermischt. Zum Ausfällen wurden 2,5 Volumen 100% eiskaltes EtOH, bei sehr großen Fragmenten (z.B. Vektoren) 2,5 Volumen Isopropanol zugegeben und gut gemischt. Die Ausfällreaktion fand für mind. 30min bei -20°C statt. Dann wurde die DNA 15min bei 14.000rpm sedimentiert (optimal 4°C), einmal mit kaltem 70% EtOH gewaschen, wieder sedimentiert, nach Verwerfen des Überstandes für etwa 5min bei RT getrocknet und abschließend in 10-30µL Aq bid resuspendiert.

#### *Fällung, Reinigung und Konzentration von DNA / RNA über Phenol-Chloroform-Extraktion*

Zu einem Nukleinsäureansatz (100-400µL) wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (Roth, Karlsruhe) gegeben und 10sek gevortext. Dann wurden die Proben 15sec bei RT invertiert und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert, um so die Phasentrennung zu erreichen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Konzentrierung der Nukleinsäuren konnten diese über eine Ethanol-Fällung weiter konzentriert werden (siehe dort). Über die Phenol-Chloroform-Extraktion konnte bei saurem pH von 4,5 auch gezielt DNA-freie RNA isoliert werden.

#### *Restriktionen*

Restriktionen zu Testzwecke wurden üblicherweise zu 15µL in Miniwellplatten angesetzt und 1,5h bei 37°C inkubiert. Zu ligierende Fragmente wurden 2-3h in Ansätzen von 20-50µL bei 37°C inkubiert. Enzyme und dazugehörige Puffer stammten von NEB, Beverly, USA oder Roche Molecular Biomedicals, Mannheim.

#### *Ligationen*

Ligiert wurde i.d.R. in 15µL mit 100ng Vektor, 1:3 bis 1:4 Insert nach der Formel  $x[\text{ng}] \text{ Insert} = X[\text{bp}] \text{ Insert} \times y[\text{ng}] \text{ Vektor} / Y[\text{bp}] \text{ Vektor}$ , 1,5µL Ligase-Puffer (10x), 5mM ATP, 1µL T4 Ligase, ad 15µL Aq bid. Die Reaktion verlief bei 4°C, 12°C oder 18°C üN. Das Enzym mit Puffer stammte i.d.R. von NEB, Beverly, USA. Alternativ wurden Produkte von Roche, Mannheim verwendet.

#### *DNA-Gel-Elektrophorese*

Mittels DNA-Gelelektrophorese in TAE- oder TBE-Gelen wurden DNA- und RNA-Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Konzentration der Agarose im TAE- / TBE-Puffer wurde nach der zu erwartenden Länge der Fragmente einer Tabelle aus Sambrook *et al.*, 1989 entnommen. Als Längenstandard dienten der 100bp- und 1kb DNA-Standard von NEB. Dokumentiert wurden die Gele über UV-Licht mit der Photodokumentations-Station von MWG Biotech, München. Ausgedruckt wurden die Bilder über den Video Copy Processor von Mitsubishi.

### *Gel-Extraktion*

DNA-Fragmenten wurden mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen, Hilden aus TAE-Agarosegelen extrahiert und in 30µL Aq bid resuspendiert.

### *PCR*

Außer für Standardapplikationen wurde die PCR wie folgt verwendet. DNS-Bereiche für Klonierungen oder die Erstellung von Deletionskassetten wurden über die Polymerase Chain Reaction (PCR/Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985) amplifiziert. Auch zur Überprüfungen der Transformation von Plasmiden (z.B. CFTR) und der Insertion oder Deletion (siehe Test von Deletionen) bestimmter Sequenzen in das Hefegenom (siehe Whole Cell PCR) fand die PCR Anwendung. Abweichend vom Standardprotokoll wurden den Amplifikationsansätzen für mEDeM (1,8kb) auf 50µL Gesamtansatz 2µL DMSO und 400µg/mL BSA zugegeben. Zur Amplifikation dieser Gesamtgenesequenz zu Klonierungszwecken wurde die VENT-Polymerase mit *proofreading*-Funktion (Fehlerkorrektur) von NEB, Beverly, USA verwendet. Für einfache Applikationen zur reinen Überprüfung wurde TAQ-Polymerase von Gibco/Invitrogen, Karlsruhe oder Roche Biomedicals, Mannheim verwendet. Fragmente für Klonierungen oder Deletionskassetten wurden über Polymerasen mit Proofreading-Funktion (Fehlerkorrektur) wie VENT-Polymerase (NEB, Beverly, USA), *DAp* Goldstar (Eurogentec, Seraing, Belgien) oder Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Oligonukleotide wurden von Sigma-ARK, Darmstadt und MWG Biotech, München synthetisiert. Der Oligonukleotidmix stammte von Eurogentec (Seraing, Belgien). Folgende Geräte wurden verwendet: Trio-Thermoblock Biometra, Göttingen; LKB-Gene ATAQ Controller, Pharmacia, Uppsala, Schweden; Stratagene (La Jolla, USA).

### *Whole Cell PCR von Hefezellen*

Von den betreffenden Hefezellen wurde eine Holzspatelspitze von der Kulturplatte in 15µL Aq bid vermischt und 10µL zu einem 50µL-PCR-Ansatz gegeben. Die Ansätze wurden ohne Polymerase 6min bei 95°C inkubiert, in den folgenden 5min bei 80°C wurde die Polymerase zupipettiert und die PCR mit 33 bis 35 Zyklen gestartet.

### *Reinigung von PCR-Fragmenten*

Wurden PCR-Produkte nicht über DNA-Fällung (siehe dort) gewonnen, fand das QIAquick PCR Purification System Verwendung.

*pdr1-3-TRP1 Vektor-Konstruktion*

Das Plasmid pAGC 28 wurde wie folgt kloniert. Ein 4,7kb Fragment von PDR1-3 wurde über die Schnittstellen *ApaI* / *SacI* aus dem Plamid pAGC 6 (pGK122) geschnitten und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pRS304 (Sikorski and Hieter, 1989) kloniert.

*Hefe-Expressionskonstrukte für mEDEM-HA*

Die Sequenz des Maus-EDEM mit N-terminalem HA-Immuneptop wurde von N. Hosokawa zur Verfügung gestellt (Hosokawa *et al.*, 2001). Für die Expression in Hefezellen wurde sie aus pCMV-SPORT2 (Invitrogen, Breda, NL) als 2,1kb-Fragment mittels PCR (Primer siehe Primer-Liste) mit *SpeI*- und *XhoI*-Schnittstellen versehen und darüber in die Vektoren p413 TEF und p423 TEF (Mumberg *et al.*, 1995) kloniert. Die Plasmide wurden in Hefe transformiert. Die Expression wurde in Western-Blots mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (Babco/Covance, Berkeley, USA) überprüft. Über Membranfraktionierung (siehe dort) konnte das Protein als membranständig lokalisiert werden.

*Sequenzierung*

Mit Sequenzierungen wurde SequiServe, Vaterstetten beauftragt. Andere Primer als Standardprimer sind der Tabelle „Primer“ zu entnehmen.

**Biochemische Methoden***Nukleinsäure-Quantifizierung*

RNA und DNA wurde i.d.R. photometrisch in Quarzküvetten bei 260nm gemessen. Die Reinheit in Bezug auf Proteinverunreinigungen wurde über die Ratio, das Verhältnis aus A260 zu A280, dem Absorptionsmaximum der Proteine bestimmt. Die Photometer waren GeneQuant II von Pharmacia Biotech und Jasco.

*Protein-Quantifizierung im Bradford-Test*

Die Proteinlösungen wurden zunächst zweimal ca. 5sec sonifiziert, um sie zu homogenisieren. Nach einer Zentrifugation von 5-10 min bei 10.000rpm und 4°C wurden 10µL der Lösung in eine Küvette gegeben, 2,5mL Bradford Reagenz (BioRad) und 50µL Ameisensäure (optional) zupipettiert und gemischt. Der Ansatz inkubierte 5min bei RT und wurde anschließend gegen einen Nullwert bei 595nm möglichst in Doppelwerten gemessen [mg Protein/mL].

### *Isolierung von Membranproteinen aus Hefe*

Hefezellen wurden in gewünschter Menge (i.d.R. pro Ansatz 10 OD<sub>600</sub>) in 100µL Tris / EDTA-Lysepuffer mit Inhibitoren resuspendiert, dazu ungefähr die gleiche Menge Glasperlen gegeben und sechs mal alternierend 1min gevortext und 1min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 3000rpm 3min sedimentiert und der Überstand (ca. 75µL) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 13.000rpm für 15min bei 4°C wurden die Membranen sedimentiert und vom Überstand getrennt. 50µL Überstand und Sediment wurden in 50µL Harnstoffpuffer aufgenommen und je nach Proteinen bei RT, 35°C oder 95°C denaturiert und á 20µL auf SDS-Gele aufgetragen. Die weitere Bearbeitung ist unter „Western Blots“ zu finden. Sollte gezielt die Membranextraktion untersucht werden, wurden die Ansätze á 250µL nach dem Aufschluss und der Abtrennung der Zellwandreste parallel mit je 250µL TE-Puffer, Natriumcarbonat (200mM), Harnstoff (5M) oder Triton X-100 (2%) je in TE-Puffer versetzt, gemischt und bei 13.000rpm 15min bei 4°C zentrifugiert. Sediment und Überstand wurden getrennt. Das Sediment wurde direkt in 50µL Harnstoffpuffer resuspendiert, Proteine aus dem Überstand wurden mit 125µL 50% TCA gefällt (5min auf Eis), abzentrifugiert und in 50µL Harnstoffpuffer aufgenommen. Auch diese Proben wurden über SDS-Gele in Western Blots untersucht. Für die direkte Untersuchung in Western-Blots wurde die Membranfraktion nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm direkt in 50µL Harnstoffpuffer resuspendiert, nicht gelöste Bestandteile 5min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und 20µL auf SDS-Gele der entsprechenden Konzentration aufgetragen.

### *SDS-Gelelektrophorese*

Nach Laemmli, 1970.

### *Western Blotting*

Standard nach Towbin *et al.*, 1979

Membranproteine (CFTR, Pdr5p, mEDEM) wurden mit Semidry Blotting Apparaturen von ITF Labortechnik, Wasserburg bei 90mA pro Gel und 70min für mEDEM, 90min für CFTR und Pdr5p von SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (FIRMA) (selten PVDF / BioRad, Hercules, USA) übertragen. Der Blotting-Puffer (Towbin *et al.*, 1979) enthielt 10% MetOH und 0,05-0,1% SDS. Die Membranen wurden in PBST (0,1% Tween20) mit 10% Magermilchpulver (Dr. Groß, Sauerlach) 1h bei RT oder üN bei 4°C geblockt. Die Antikörper wurden in 5%BSA-PBST verdünnt und 1h bei Raumtemperatur auf den Blots belassen. Die Konzentrationen der Erst- und Zweit-Antikörper sind im Anschluss zusammengefasst. Abschließend wurde über das ECL-Kit von AmershamPharmacia Biotech (Little Chalfont, GB) detektiert.

## CFTR

Erst-Antikörper: M3A7 (mouse) 1:5.000; R&D C-Term. (mouse) 1:1.000

Zweit-Antikörper: Anti Mouse (ECL) 1:10.000

## Pdr5

Erst-Antikörper:  $\alpha$ N-1 (rabbit) 1:2.500 bis 1:5.000 möglich; anti-HA (mouse; BABCO) 1:10.000

Zweit-Antikörper: anti rabbit ECL 1:10.000; anti mouse ECL 1:15.000

## CPY\*

Erst-Antikörper:  $\alpha$ CPY (mouse) 1:10.000

Zweit-Antikörper: anti-HA (mouse; BABCO) 1:10.000

## mEDEM

Erst-Antikörper: anti-HA (BABCO) 1:10.000

Zweit-Antikörper: anti Mouse 1:15.000

*CPY\*-Abbau im Cycloheximid-Chase*

Zu logarithmisch wachsenden Hefezellen wurde Cycloheximid (200 $\mu$ g/mL) gegeben und damit die Proteinbiosynthese gestoppt (Zeitpunkt  $t=0$ ). Pro Zeitpunkt wurde Zellsuspension korrespondierend zu 2OD<sub>600</sub> durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Danach wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblottet und immunodetektiert.

*IP von CFTR und Pdr5p / Pdr5\*p aus Hefe*

Die Proteine CFTR und Pdr5p / Pdr5\*p wurden neben dem Western-Blotting auch als radioaktiv markierte Proteine über Immunopräzipitation (IP) in Hefezellen nachgewiesen. Weiterhin wurde die hier beschriebene Methodik auch in den Pulse-Chase-Analysen verwendet. In beiden Fällen wurden die Zellen bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,2 angezogen, die gewünschte Menge Zellen abgenommen (3 OD<sub>600</sub> / Messpunkt) und in 0,5mL / 3 OD<sub>600</sub> Schwefel-freiem Hungermedium resuspendiert. Die Ansätze wurden für 1-2h bei 25°C inkubiert und anschließend mit 20 $\mu$ Ci/OD<sub>600</sub> <sup>35</sup>S TRANS Label (ICN Biomedicals, Aurora, USA) für 30min bis zu 1h markiert. Je Probe wurden 0,5mL Zellen aliquotiert, mit 10mM NaN<sub>3</sub> gewaschen und das Sediment bei -80°C eingefroren oder bei direkter Weiterbearbeitung auf Eis gelagert. Aufgeschlossen wurden die Zellen in 100 $\mu$ L Aufschlusspuffer (50mM Tris pH7,6, 1mM EDTA und Protease-Inhibitor-Cocktail) mit der gleichen Menge Glasperlen durch sechsmaliges abwechselndes Vortexen und Inkubieren auf Eis für je 1min. Folgende Protease-Inhibitoren wurden verwendet: Complete™ mit EDTA (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Herstellerangaben (Stamm 100x in Aq. bid.); 1mM Pefabloc (Merck, Darmstadt / Stamm 1M in Aq. bid.); 1mM PMSF (Sigma, Deisenhofen / Stamm

1M in DMSO); 391,5µg/mL Benzamidin, 2µg/mL Chymostatin und 2µg/mL Pepstatin (Stamm 1.000x in DMSO); 1µg/mL Leupeptin, 2µg/mL Aprotinin und 121µg/mL Benzamidin (Stamm 1.000x in Aq. bid.). CFTR-Proben wurden dann 35µL 4x Zell-Solubilisierungspuffer (4% SDS, 600mM NaCl, 50mM Tris pH 7,5) zugegeben und die Ansätze 10min bei RT invertiert. Nach Zugabe von 1,2 mL IP-Puffer (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 1% DOC, 1% Triton X-100) und Lösen des Sediments durch Invertieren oder sehr kurzes (!) Vortexen wurde unlösliches Material für 15min bei 13.000rpm abzentrifugiert. Der Überstand (1,1mL) wurde in ein frisches Schraubdeckel-Eppendorf (SDE)-Gefäß überführt und mit 2µL M3A7-Antikörper (von J.R. Riordan, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA) bei 4°C üN inkubiert. Der Antikörper (mit CFTR) wurde mit A/G Agarose (Oncogene, Boston, USA) 4-5h bei 4°C präzipitiert, die Proben 4x mit RIPA-Puffer (IP + 0,1% SDS) gewaschen und in 50µL 2xSDS-Probenpuffer (125mM Tris pH6,8, 20% Glycerin, 2%SDS, 2% β-ME, 100mM DTT und Bromphenolblau) für 30min bei RT denaturiert. Die Proben wurden á 20µL auf 7% SDS-Gelen aufgetrennt, die Gele getrocknet und die Radioaktivität nach 5 Tagen Belichtung mit dem PhosphoImager (MolecularDynamics, Sunnyvale, USA) und den Computerprogrammen ImageQuant und Excel quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die IP und Pulse-Chase von Pdr5\*p folgte in Abweichungen dieses Protokolls den Anleitungen aus Plemper *et al.*, 1998.

Wichtig für Transmembranproteine war das stete Kühlen auf Eis, die Inhibitoren und das Vermeiden von SDS in zu vortexenden Proben. Alle Zentrifugationen fanden bei 4°C statt. Antikörper-Inkubation üN bei 4°C lieferte bessere Ergebnisse als kürzere Zeiten bei RT. Generell wurden bei Arbeiten mit Radioaktivität Schraubdeckel-Gefäße verwendet.

### *Pulse-Chase*

#### CFTR und Pdr5p / Pdr5\*p

Folgte dem IP-Protokoll. Die Markierung mit Radioaktivität wurde durch Waschen und weiterer Inkubation der Zellen in entsprechendem CM-Standardmedium oder durch Zugabe von 1:100 100x Chase-Lösung (100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,4% L-Methionin; 0,3% L-Cystein) zum Markierungs-Medium beendet. Es wurden in der Regel 5 Zeitpunkte genommen (0; 15; 30; 60; 90min).

#### CPY\*

Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 angezogen, je Chase-Zeitpunkt 2,5 OD<sub>600</sub> / 0,5mL in Schwefel-freiem Hungermedium mit 0,1% Glukose zur Induktion der CPY\*-Expression unter CPY-Promotor-Kontrolle resuspendiert und 50min bei 30°C inkubiert. Zum radioaktiven Markieren wurden 20µCi / OD<sub>600</sub> <sup>35</sup>S-Methionin (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, GB / TRANS-Label, ICN, Aurora, USA) zugegeben und für 20min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 1/2 Ansatz-Volumen Chase-Medium (Hungermedium + 6mg/mL Methionin, 2mg/mL BSA)

wurde das Markieren gestoppt und der *Chase* gestartet. Proben wurden á 450µL zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90min genommen und mit 50µL 110% TCA gemischt. Proben konnten bei -80°C eingefroren oder zur Weiterbearbeitung auf Eis gelagert werden. Das Sediment wurde einmal mit eiskaltem Azeton gewaschen und das Sediment in 100µL Lyse-Puffer (50mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 6M Harnstoff; 1% SDS) mit 2/3 Vol Glasperlen 6x abwechselnd für 1min bei 95°C inkubiert und gevortext. Dann kamen die Proben auf Eis, 1mL IP-Puffer (50mM Tris pH 7,5; 6mM EDTA; 190mM NaCl; 1,25% Triton X-100; Complete™, Roche, nach Herstellerangaben) wurde zugegeben, die Proben gevortext und für 15min bei 13.000rpm zentrifugiert. Zu 950µL ÜS wurden 3µL eines αCPY Antikörpers aus Kaninchen gegeben. Inkubiert wurde 1h bei RT oder bei 4°C üN. Je Probe wurden derweil 5mg Protein A-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) in 80µL IP-Puffer ohne Triton bei 4°C für 30min aufgequollen. Diese wurde á 80µL zu den Ansätzen gegeben und 1h bei RT inkubiert. Das Sediment wurde 3x mit 1mL IP-Puffer gewaschen und in 60µL Harnstoffpuffer (40mM Tris pH 6,8; 0,1mM EDTA; 8M Harnstoff, 5% SDS; 0,01% Bromphenolblau; 1% β-ME (frisch)) mit 1,5% DTT 4min bei 95°C denaturiert. 15µL einer Probe wurden auf 8-10% SDS-Gelen aufgetrennt, getrocknet und wie für CFTR und Pdr5p beschrieben ausgewertet.



# Ergebnisse

## Etablierung der Expression von humanem CFTR in Hefe

Für die Identifizierung neuer Faktoren der Qualitätskontrolle und des Abbaus von humanem CFTR-Protein wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewählt. Wie bereits erwähnt bietet dieser Modellorganismus neben der detaillierteren Kenntnis der Prozesse der Qualitätskontrolle und des ERAD vor allem die Möglichkeit, einige Hefestämme mit Mutationen in zu untersuchenden Genprodukten dieser beiden Prozesse direkt zu verwenden, bzw. noch nicht vorhandene leicht zu generieren. Für die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Hefe auf die Säugerzelle spricht die bereits an anderen Faktoren der Qualitätskontrolle und des ERAD gezeigte hohe Übereinstimmung zwischen Hefen und Säugerzellen.

Es sind zwei Expressionsmodelle von humanem CFTR in Hefe bekannt. Während bei Zhang *et al.* (2001) die Zellen durch ein Überexpressionskonstrukt mit CFTR geflutet werden, scheint das schwächer exprimierte PDR5-CFTR-Konstrukt von G. Kiser (Kiser *et al.*, 2001) eher der normalen Expressionsrate von CFTR in Zellkultur oder vergleichbaren Proteinen in Hefe zu entsprechen und somit aussagekräftiger zu sein. Dieses Konstrukt wurde daher als Grundlage für die nachfolgenden Studien gewählt. Dabei wurde das WT-CFTR-Protein und nicht die  $\Delta F508$ -Mutante verwendet. Da nach Kiser *et al.*, 2001 das Wildtypprotein in Hefe in gleichem Maße wie die  $\Delta F508$  CFTR-Mutante abgebaut wird, scheinen im Abbau des Proteins in Hefe keine Unterschiede zu existieren. Zudem zeigte WT-CFTR in den Etablierungsversuchen leicht erhöhte *steady state*-Mengen und, wie in Abbildung 9 gezeigt, gegenüber erhöhter Temperatur etwas stärkere Stabilität gegenüber der Mutante  $\Delta F508$ .

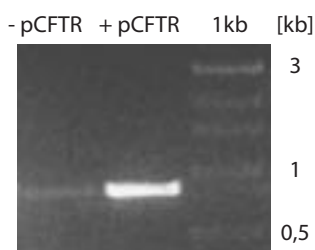
Der cDNA-ORF von CFTR wird in dem von Kiser *et al.* hergestellten Konstrukt von Promotor und Terminator des strukturverwandten Hefe-ABC-Transporter-Gens PDR5 (Balzi *et al.*, 1994; Bissinger and Kuchler, 1994) flankiert. Dieser ORF wurde in einem zentromerischen Hefe-Expressionsvektor (pKV 2 / Katzmann *et al.*, 1994) über Standardtransformation (Soni *et al.*, 1993) in die Hefe-Zellen eingebracht.



**Abbildung 5. Vektorkonstrukt für die Expression von CFTR in Hefe.** Der gesamte ORF des humanen CFTR wurde zwischen den Promotor (P) und den Terminator (T) des Hefe-ABC-Transporters *PDR5* kloniert. Der Expressionsvektor ist zentromerischer Natur und besitzt als Selektionsmarke in Hefe das *URA3*-Gen.

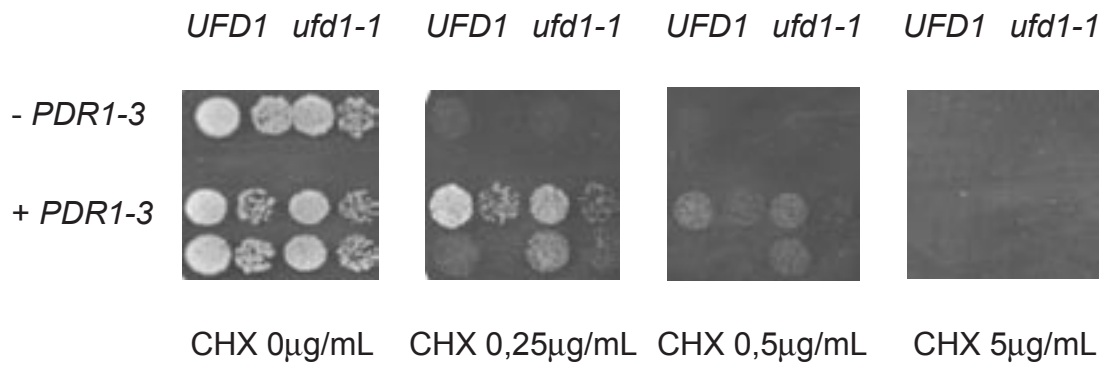
Über den Vektor wurde neben dem CFTR-Gen auch ein Prototrophie-Marker in die Zellen eingeschleust. In diesem Falle trug der Vektor das *URA3*-Gen, das Uracil-auxotrophen Stämmen Wachstum auf Uracil freien Platten (CM-ura) erlaubte und eine erste Selektion Plasmid-tragender Stämme ermöglichte (Kiser *et al.*, 2001).

Zusätzlich wurde das Vorhandensein des CFTR-Gens über *whole cell*-PCR getestet. Hierfür wurden Primer (siehe Primer-Liste) verwendet, die in der Sequenz der zytoplasmatischen NBD1 von CFTR binden konnten und ein etwa 800bp großes Fragment bildeten (Abb. 6). Die leichte Bande in der Negativkontrolle beruht sehr wahrscheinlich auf der Amplifikation eines homologen Bereichs des Hefegens, das sowohl sequenziell als auch strukturell die höchste Übereinstimmung mit CFTR zeigt, des ABC-Transporters YCF1 (Falcon-Perez *et al.*, 1999). Die Bandenintensitäten sind allerdings so unterschiedlich, dass eindeutige Aussagen zum Vorhandensein von CFTR in den Hefezellen möglich sind.



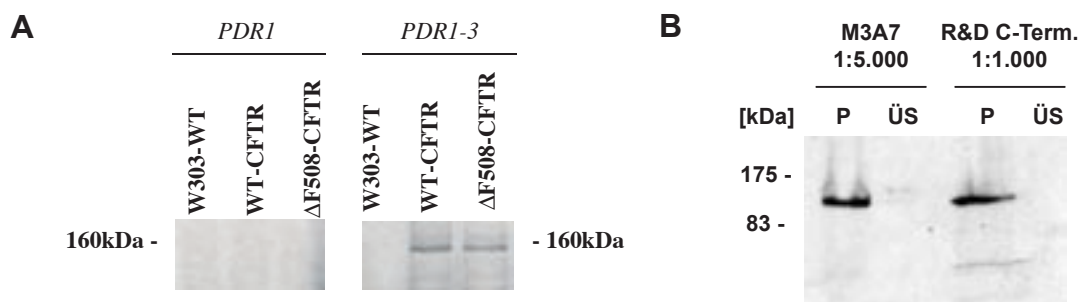
**Abbildung 6. Nachweis des CFTR-Gens in Hefe mittels PCR.** 5µL einer *whole cell*-PCR wurden auf 1% Agarose-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Die PCR lieferte bei Vorhandensein des CFTR-Gens auf seinem Vektor eine deutliche Bande bei etwa 800bp, entsprechend der amplifizierten Sequenz aus der NBD1 (+pCFTR). In der Negativkontrolle ohne CFTR (-pCFTR) ist i.d.R. eine leichte Bande zu erkennen, die auf der Amplifikation des homologen Bereichs des Hefe-ABC-Transporters YCF-1 beruht. Als Längenstandard diente die 1kb *ladder* von NEB.

Der CFTR-tragende Vektor lieferte nicht genug CFTR-Protein, um es in einem Western-Blot oder einer IP detektieren zu können (Abb. 8 A). Da CFTR unter der Kontrolle des Promotors von PDR5 ist, unterliegt es den gleichen Regulationsmechanismen wie sein Hefehomologes. PDR5-Transkription unterliegt der Induktion durch den Transkriptionsfaktor Pdr1p (Balzi *et al.*, 1987), der neben PDR5 auch die ABC-Transporter-Gene SNQ2 und YOR1 reguliert (Meyers *et al.*, 1992; Balzi *et al.*, 1994 / Decottignies *et al.*, 1995 / Katzmann *et al.*, 1995). E. Carvajal und Kollegen beschrieben 1997 unter anderem die *gain of function*-Mutante *PDR1-3*, die erhöhte mRNA von PDR5 aufwies (Carvajal *et al.*, 1997). Über integrative Plasmide wurde diese Mutation in alle Hefestämme eingebaut, die auf ihr Verhalten gegenüber CFTR-Abbau in der Folge untersucht werden sollten. Der Einbau des *PDR1-3*-Gens konnte über Auxotrophiemarker und den CHX-Resistenz-Test (Abb. 7) nachgewiesen werden. Die erhöhte Resistenz gegenüber diesem Proteinsynthesehemmer beruht auf der durch *PDR1-3* verstärkten Expression von Pdr5p, welches Cycloheximid aus den Zellen heraustransportiert. Alle Stämme mit einer *PDR1-3*-Mutation zeigten verstärkte Resistenz gegenüber Cycloheximid (CHX) und konnten so von WT-Stämmen unterschieden werden. Abb. 7 zeigt ein typisches Bild dieses Tests. Die Stämme mit deutlich gesteigerter Resistenz wurden für weitere Tests und/oder die Experimente mit CFTR verwendet.



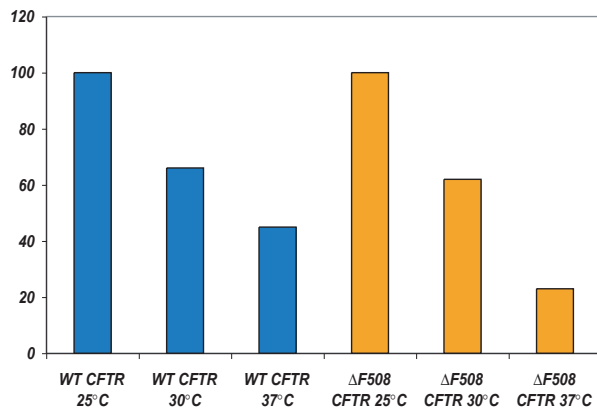
**Abbildung 7. CHX-Resistenz-Test von Hefestämmen mit und ohne *PDR1-3*-Mutation.** Hefestämme wurden nach ihrer Transformation mit *PDR1-3* gegen ihre nicht transformierten Ausgangsstämme als Referenz der Resistenz in zwei Verdünnungen aufgetropft. Die Kulturplatten enthielten ansteigende Konzentrationen von CHX (0; 0,25; 0,5; 5µg/mL). Wuchsen Zellen noch bei 5µg/mL CHX, wurden sie als falsch-positiv verworfen. Als Beispiel sind die Stämme YWO 0377 (*UFD1*) und YWO 0378 (*ufd1-1*) gezeigt, die in später gezeigten Versuchen verwendet wurden.

Die aufgrund der *PDR1-3*-Mutation erzielte Expressionsrate von CFTR war hoch genug, um das Protein in Hefe immunologisch detektieren zu können, und zwar sowohl in IPs als radioaktiv markiertes Protein (Abb. 8 A) als auch in Western-Blots (Abb. 8 B).



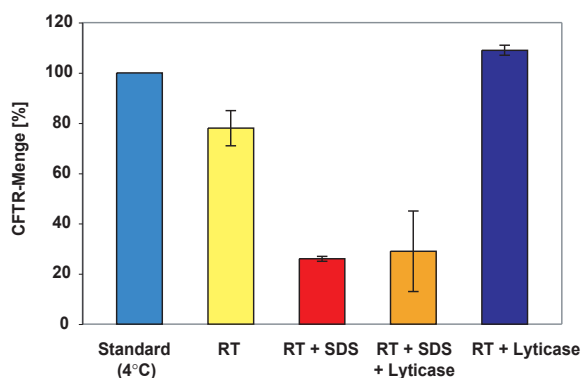
**Abbildung 8. Immunologischer Nachweis von in Hefe exprimiertem humanem CFTR-Protein.** Das Protein wurde wie in Material und Methoden beschrieben exprimiert und isoliert. In beiden Fällen wurde eine Membranfraktion und eine Zytosol-Fraktion auf 8%-SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. A. Nachweis in der IP. Proteine wurde mit  $^{35}\text{S}$  markiert und immunopräzipitiert. CFTR wurde als deutliche Bande bei etwa 150kDa auf BioMax™-Filmen (Kodak) oder mit PhosphoImager-Kassetten (Molecular Dynamics) nachgewiesen. Das linke Bild zeigt Hefestämme ohne (W303-WT) und mit CFTR (WT-CFTR /  $\Delta\text{F508-CFTR}$ ), aber ohne *PDR1-3*. Im rechten Bild sind die gleichen Stämme mit *PDR1-3*-Mutation gezeigt. Nur diese Mutation ermöglicht detektierbare CFTR-Level in diesem System. B. Nachweis von CFTR im Western Blot in Stämmen mit *PDR1-3*- Mutation: Proteine wurden im Semi Dry-Blot für 90min bei 90mA auf Nitrocellulose-Membranen (Pall) übertragen. CFTR (hier WT) wurde mit den Antikörpern M3A7 (1:5.000 / Kartner *et al.*, 1993) und CFTR C-Terminus (1:1.000 / R&D Systems) detektiert und über ECL (Amersham-Pharmacia) nachgewiesen. In beiden Fällen ist das Signal nur in den Membranfraktionen bei etwa 140-150kDa zu erkennen, was der Lokalisierung des *core*-glykosylierten Proteins im ER entspricht.

Die CFTR-Expression wurde in weiteren Vorversuchen optimiert. Es ist einerseits bekannt, dass die Pdr5p-Expression bei sinkenden Temperaturen induziert wird (Lashkari *et al.*, 1997), andererseits wird CFTR bei niedrigeren Temperaturen in Zellkultur zu einem gewissen Teil stabilisiert (Denning *et al.*, 1992). Deshalb wurde der Einfluss der Temperatur auf die Expressionsrate untersucht. Zellen wurden bei verschiedenen, für die Kultivierung von Hefezellen üblichen Temperaturen (25°C, 30°C, 37°C) in Flüssigmedium angezogen. Tatsächlich stieg die Menge des detektierbaren CFTR mit abfallender Temperatur mit einem Maximum bei 25°C (Abb. 9). Daher wurden alle Experimente soweit möglich bei 25°C durchgeführt.



**Abbildung 9. Einfluss der Temperatur auf die Expressionsmenge von CFTR.** Hefezellen zeigen abnehmende Expressionsspiegel bei zunehmender Kultivierungstemperatur. Die größte gemessene Proteinmenge wurde für WT- und ΔF508-CFTR unabhängig mit 100% gleichgesetzt und die restlichen Werte dagegen korreliert.

Die Halbwertszeit von CFTR variierte allgemein mit den Stammhintergründen und schwankte zwischen 40 - 50min. Zur Gewinnung der zu untersuchenden Proteine aus den verwendeten Hefestämmen wurden die Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen. Der Zellaufschluss ist niemals vollständig. Zellzählungen ergaben eine Aufschluss-Effizienz von etwa 70-80%. So war auch dies ein möglicher Punkt von Signalverlust oder Schwankungen der CFTR-Menge. Daher wurde der Einfluss eines Zellsolubilisierungsfördernden Enzyms in Verbindung mit, oder ohne SDS-Zugabe auf die CFTR-Signalstärke getestet. Abb. 10 zeigt, dass mit Zugabe des Zellwand-abbauenden Enzyms Oxo-Lyticase (Enzogenetics) nur eine geringfügige Verbesserung des Aufschlusses zu



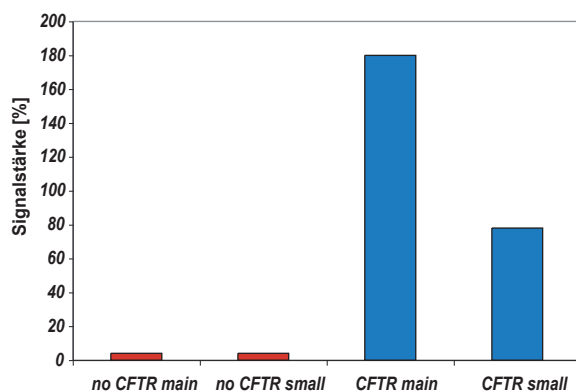
zusätzlich 1% SDS im Lysepuffer. „RT+SDS+Lyticase“ wurde weiterhin Oxo-Lyticase (Enzogenetics) nach Herstellerangaben zugesetzt. Die Probe „RT+Lyticase“ enthielt Oxo-Lyticase aber kein SDS.

**Abbildung 10. Einfluss verschiedener Zellaufbruchbedingungen auf die CFTR-Menge.** Je 3 OD<sub>600</sub> Zellen wurden in Doppelwerten bis auf den Zellaufbruch identisch behandelt und einer IP unterzogen. Bei der Auswertung wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung graphisch dargestellt und die Proteinmenge aus den 2 Proben des Aufschlusses nach Material und Methoden („Standard“) als 100% CFTR-Menge festgesetzt. Die Probe „RT“ wurde zwischen den 6 Vortex-Schritten nicht auf Eis gekühlt, sondern bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. „RT+SDS“ enthielt

erzielen war. Daher wurde auf die Verwendung des Enzyms verzichtet. Dahingegen führte die Zugabe von SDS in den Zellaufschlusspuffer während des Glasperlenaufschlusses zu einem geradezu dramatischen Abfall des detektierbaren Proteins. Zudem zeigte sich, dass eine stete Kühlung der Proben von Vorteil für die Stabilität des CFTR-Signals war.

In den Protein-Gelen fand sich neben der CFTR-Hauptbande von etwa 150kDa stets zumindest eine mit CFTR auftauchende Bande bei etwa 80kDa, die in Vergleich-IPs ohne CFTR nicht an dieser Stelle auftrat (Abb. 11). Das Auftreten dieser Bande könnte auf Abbaufragmenten des Proteins nach einem proteolytischen Schnitt in der zytosolischen R-Domäne beruhen, wie sie auch in Säugerzellen auftreten (Lukacs *et al.*, 1994; Van Oene *et al.*, 2000). Dieses Phänomen wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Es darf allerdings als Hinweis darauf angesehen werden, dass dieses und eventuell auch andere große Membranproteine mit zytosolischen Domänen möglicherweise nicht am Stück, sondern in Fragmenten dem Abbau zugeführt werden bzw. werden können. Ob dies charakteristisch eventuell für proteasomalen Abbau ist oder andere Mechanismen impliziert, sei dahingestellt.

Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten dieses Fragmentes wäre die Spaltung des Proteins im Verlauf der Proteinisolierung aus den Hefezellen. Hierfür kämen vor allem nicht vollständig deaktivierbare vakuoläre Proteasen in Frage, die durch die Zerstörung der Zellorganellen frei werden.

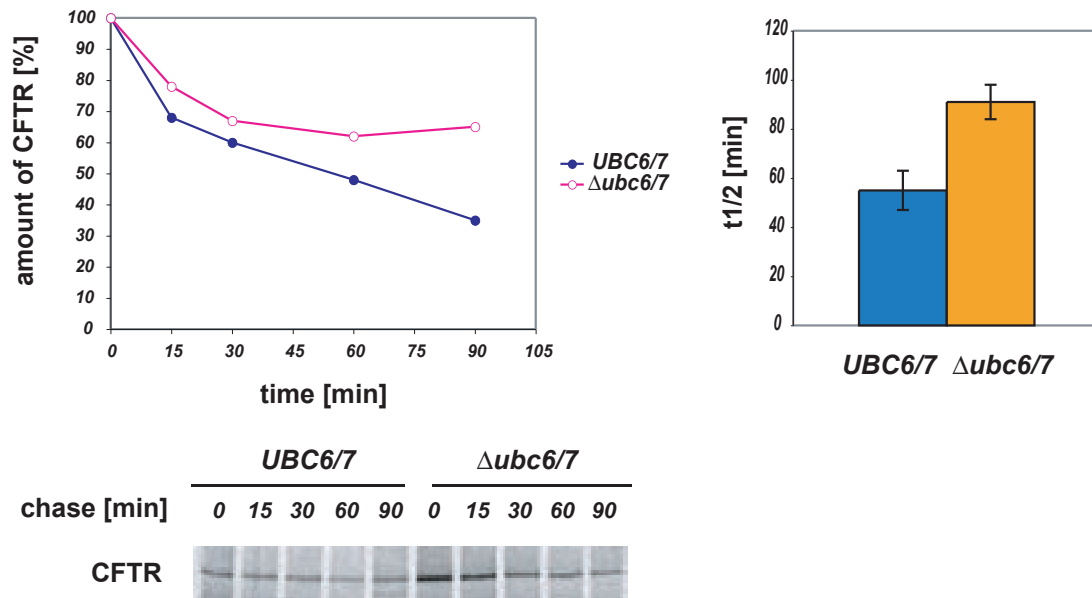


**Abbildung 11. CFTR-spezifische Unterbanden als Hinweis auf Abbau-Fragmente.** Neben der CFTR-Hauptbande bei etwa 150kDa tritt zumindest eine gut erkennbare Bande bei etwa 80kDa auf. Stämme mit („CFTR“) und ohne („no CFTR“) das CFTR tragende Plasmid wurden einer IP unterzogen und mit M3A7-AK auf CFTR detektiert. Das Signal wurde mit PhosphoImager über ImageQuant ausgewertet. Die Messbereiche der Stämme ohne CFTR wurden auf eine Signalstärke von 1% festgelegt und dagegen die Intensität der Bereiche der CFTR tragenden Stämme korreliert. Sowohl die Hauptbande bei

150kDa („CFTR main“) als auch die Bande bei etwa 80kDa („CFTR small“) lagen deutlich über dem Hintergrund des Stammes ohne CFTR-Expression.

Das humane CFTR-Protein war grundsätzlich in Hefezellen nachweisbar. Nun sollte gezeigt werden, dass das auf Kiser *et al.* (2001) beruhende CFTR-Expressionsmodell auch in dieser Studie reproduzierbare Ergebnisse über Qualitätskontroll- und Abbau-Prozesse in *Pulse Chase*-Versuchen liefern konnte. Hierzu wurden Experimente mit einem Hefe-Stamm durchgeführt, der Deletionen in den beiden Ubiquitin konjugierenden Enzymen Ubc6p und Ubc7p trägt. Aus publizierten Daten ist bekannt, dass CFTR in Hefestämmen mit den beiden  $\Delta$ ubc6- und  $\Delta$ ubc7-

Deletionen eine deutlich verlangsamte Abbaurrate aufweist, und diese beiden Ubc-Proteine somit eine Rolle im Abbau von CFTR spielen (Kiser *et al.*, 2001). In der Tat konnte eine signifikante Verlangsamung des CFTR-Abbaus in diesem  $\Delta ubc6\Delta ubc7$ -Stamm gemessen werden, was ein Beleg für die Funktionalität des verwendeten Systems ist (Abb. 12).



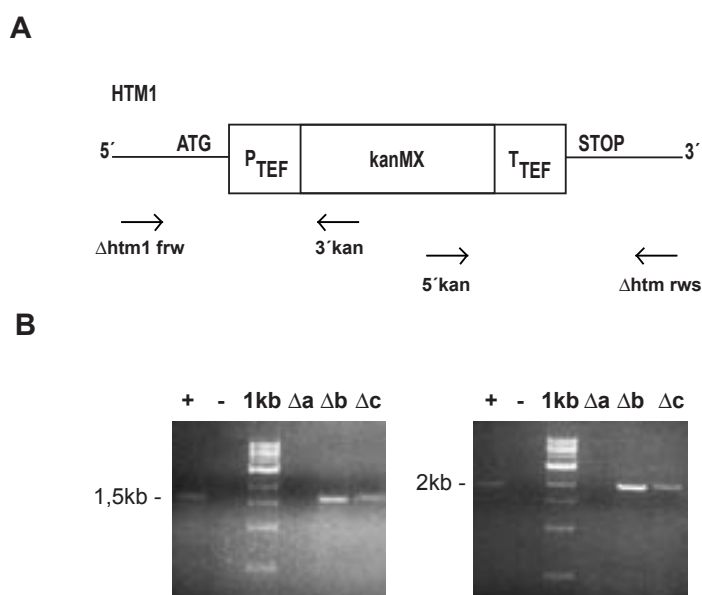
**Abbildung 12. Die Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyme Ubc6p und Ubc7p sind an der Ubiquitinierung von humanem CFTR in Hefe beteiligt.** Die Proben wurden wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben gewonnen. Die CFTR-Menge zum Zeitpunkt 0 wurde auf 100% festgelegt. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-Pulse Chase-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit von CFTR im WT-Stamm (*UBC6/7*) und im Deletionsstamm ( $\Delta ubc6/7$ ) in Minuten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Experimente. So lange es zu keiner Überlappung dieser Fehlerbalken in den Diagrammen der Halbwertszeit kommt, kann man von statistisch signifikanten Unterschieden in der Halbwertszeit sprechen. Damit hat die entsprechende Mutation einen Einfluss auf den Abbau des betrachteten Proteins. Das Autoradiogramm zeigt das Bandenmuster von CFTR in einem 7%-SDS-Gel eines typischen Versuchs.

## Einfluss des ER-Lektins Htm1p auf den Abbau von CFTR

CFTR ist ein Glykoprotein mit zwei Glycosylierungsstellen an den Positionen N894 und N900, an die im ER-Lumen co-translational Kohlenhydratketten angehängt werden (Riordan *et al.*, 1989). Diese Glykosylierung erfährt das Protein auch in Hefe (Kiser *et al.* 2001). Der Glykosylierung wird in der Qualitätskontrolle des ER eine Funktion als Zeitgeber zugesprochen (Helenius and Aebi, 2001). Dabei werden Glykoproteine im ER zurückgehalten, bis sie korrekt gefaltet sind und erst dann für den Austransport über den sekretorischen Weg freigegeben. Proteine, die sich nicht richtig falten können, werden dem Abbau zugeführt. Während des Faltungsprozesses sind monoglukosylierte Glykoproteine mit den Kohlehydratstrukturen Glukose1 Mannose7-9 N-Acetyl-Glucosamin 2 (Glc1Man7-9GlcNAc2) an die Lektine Calnexin oder Calreticulin gebunden.

Die Abspaltung des Mannose9-Restes des Kohlehydratrestes zur Glc1Man8GlcNAc2-Struktur durch die Mannosidase I und die folgende Deglukosylierung durch Glucosidase II lösen das Glykoprotein aus seiner Interaktion mit Calnexin/Calreticulin und es wird an die neu identifizierten Lektine Htm1p in Hefe bzw. EDEM in Säugerzellen (Nakatsukasa *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2001; Hosokawa *et al.*, 2001) gebunden. Das führt in der Folge zum Abbau des Glykoproteins. Jakob *et al.* konnten zeigen, dass das lösliche Glycoprotein CPY\* sowie die Transmembranproteine Pdr5\*<sub>p</sub> und Stt3-7<sub>p</sub> durch die Abwesenheit von Htm1p in Hefe in unterschiedlichem Ausmaß in ihrem Abbau beeinflusst werden. Hosokawa *et al.* testeten die Funktion von Mäuse-EDEM (mEDEM), welches zu 92% identisch zu seinem Menschenhomolog ist. Die Überexpression des Proteins in Säugerzellen führte zu gesteigerten Abbauraten einer mutierten Form des Plasma- $\alpha$ 1-Antitrypsins, von dem bekannt ist, dass es der ER-Degradation unterliegt.

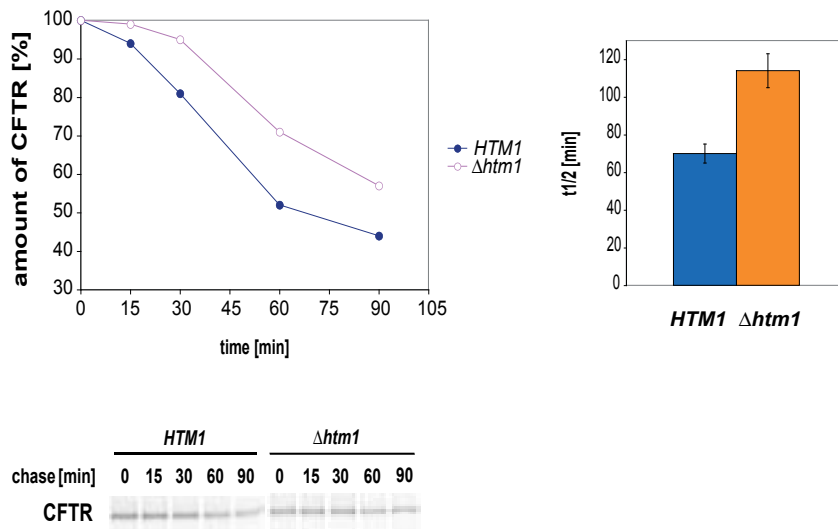
Es wurde die Frage gestellt, ob die Glykosylierung von CFTR eine Rolle für seinen Abbau spielt und ob die Lektine Htm1p/mEDEM an diesen Prozessen beteiligt sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde *HTM1* in dem Hefestamm YWO 500 über ein Kanamycin-Fragment mit flankierenden *HTM1*-homologen Bereichen deletiert (Longtine *et al.*, 1998; Wach *et al.*, 1994). Mit den Oligonukleotiden 5' HTM1 und 3' HTM1 wurde ein etwa 2,3kb großes Fragment aus dem diploiden  $\Delta$ *htm1*-Stamm der Deletionsstammbank von EUROSCARF (Frankfurt am Main) amplifiziert und in die Hefezellen transformiert. Die Deletion wurde über die Kanamycin-Resistenz und über PCR mit den Oligonucleotiden  $\Delta$ htm1 frw und 3'kan, bzw. 5'kan und  $\Delta$ htm1 rws nachgewiesen. In Abbildung 13 ist ein Schema der Deletionskassette und die Test-PCRs gezeigt.



**Abbildung 13. Deletion von *HTM1* in YWO 500.** A. Schema der Deletionskassette. Der größte Teil des ORFs von *HTM1* wurde durch die Kassette ersetzt. Das Kanamycin-Resistenzgen wird von Promotor und Terminator des Hefe-Transkriptions-Elongationsfaktors 1 (TEF) flankiert. B. Überprüfung der Deletion mittels PCR. „+“ steht für die Positivkontrolle, hier der  $\Delta$ *htm1*-Stamm aus der EUROSCARF-Stammbank, „-“ ist ein Stamm mit *HTM1*-Gen,  $\Delta$ a bis  $\Delta$ c sind Deletionsstämme von YWO 500. Mit Hilfe der Oligonukleotide  $\Delta$ htm1 frw und 3'kan wurde aus der genomischen DNA der Deletionsstämme ein etwa 2kb großes Fragment und mit den Oligonukleotiden 5'kan und  $\Delta$ htm1 rws ein etwa 1,5kb großes Fragment

amplifiziert. Während sich Klon  $\Delta$ a als falschpositiv erwies, zeigten  $\Delta$ b und  $\Delta$ c die erwarteten Banden entsprechend der Positivkontrolle (+) und wurden für die weiteren Versuche verwendet.

In den so erzeugte Deletionsstamm  $\Delta htm1$  wurde das CFTR-tragende Plasmid transformiert (YAG 129) und dieser Stamm für die Pulse-Chase-Experimente verwendet. Diese zeigten tatsächlich einen verlangsamten Abbau von CFTR (Abb. 14). Das Hefe-Lektin ist also in der Lage, das heterolog exprimierte Glycoprotein CFTR zu erkennen und seinen Abbau zu beeinflussen.

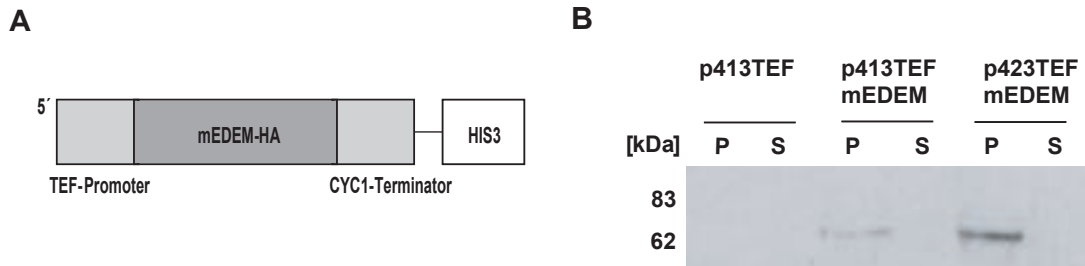


**Abbildung 14. Die Deletion von *HTM1* verlangsamt den Abbau von CFTR.** Die Hefezellen wurden wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben behandelt. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-Pulse Chase-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit von CFTR im WT-Stamm (*HTM1*) und im Deletionsstamm ( $\Delta htm1$ ) in Minuten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Experimente. Das Autoradiogramm zeigt das Bandenmuster von CFTR in einem 7%-SDS-Gel eines typischen Versuchs.

## Expression des *HTM1*-homologen Säuger-Lektins EDEM in Hefe und sein Einfluss auf den Abbau verschiedener Substrate in $\Delta htm1$ -Hefestämmen

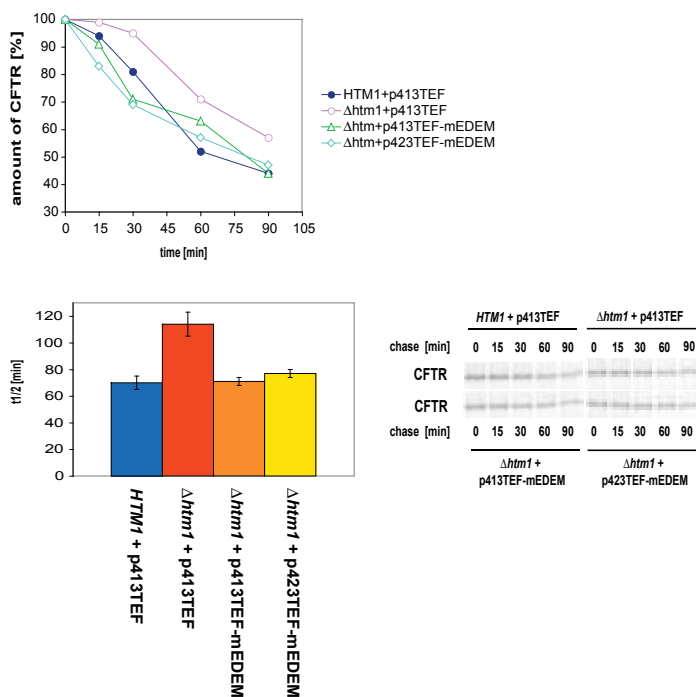
Es sollte nun überprüft werden, ob das Säugerprotein EDEM den Defekt der *HTM1*-Deletion komplementieren kann. Die cDNA von mEDEM (Maus) mit C-terminalem HA-Epitop wurde von N. Hosokawa (Hosokawa *et al.*, 2001) zur Verfügung gestellt. Diese wurde über die Restriktionsenzyme *SpeI* und *XhoI* in die Hefeexpressionsvektoren p413TEF (*low copy* / Mumberg *et al.*, 1995) und p423TEF (*high copy* / Mumberg *et al.*, 1995) kloniert (Abb. 15 A) und in  $\Delta htm1$ -Hefezellen exprimiert. Das heterologe Protein konnte immunologisch mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (Babco/Covance) in Membranfraktionen nachgewiesen werden (Abb. 15 B). Dies deutet darauf hin, dass mEDEM, welches in Säugerzellen in der Membran des ER lokalisiert ist und sein Substrat im ER-Lumen bindet, auch in Hefe in der ER-Membran lokalisiert ist.





**Abbildung 15. mEDEM wird auch in Hefe als Membranprotein exprimiert.** A. Darstellung des Expressionsvektors p413TEF (centromerisch) / p423TEF (2 $\mu$ ) (Mumberg *et al.*, 1995) mit der Sequenz von mEDEM und seinem C-terminalen HA-Immuneptop. mEDEM wird von dem Hefe-Promotor des Transkriptions-Elongationsfaktor 1-Gens (TEF) und dem Terminator des Cytochrom-C-Oxidase-Gens (CYC) flankiert. B. Hefezellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 1 in Selektivmedium angezogen. Je Probe wurden 10 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, in 100 $\mu$ L Aufschlusspuffer resuspendiert und mit Glasperlen aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation des Debris wurden die Membranen bei 13.000rpm und 4°C sedimentiert. Die Membranen und 50 $\mu$ L des Überstandes wurden in 50 $\mu$ L Harnstoffpuffer aufgenommen und 15min bei RT inkubiert. Die Proteine wurden in 10% SDS-Gelen aufgetrennt und in Semi Dry-Blots bei 90mA für 70min auf Nitrocellulose übertragen. Nachgewiesen wurde das Protein mit  $\alpha$ HA und dem ECL-System von Amersham-Pharmacia. Das Protein läuft entsprechend seiner Größe bei etwa 70kDa. Wie die Negativkontrolle (p413TEF) zeigt, ist der Nachweis sehr spezifisch und zeigt bei Expression von p423TEF-mEDEM, dem stark exprimierenden Vektor, eine deutlich stärkere Bande als bei der Expression des centromerischen Plasmids p413TEF mit mEDEM.

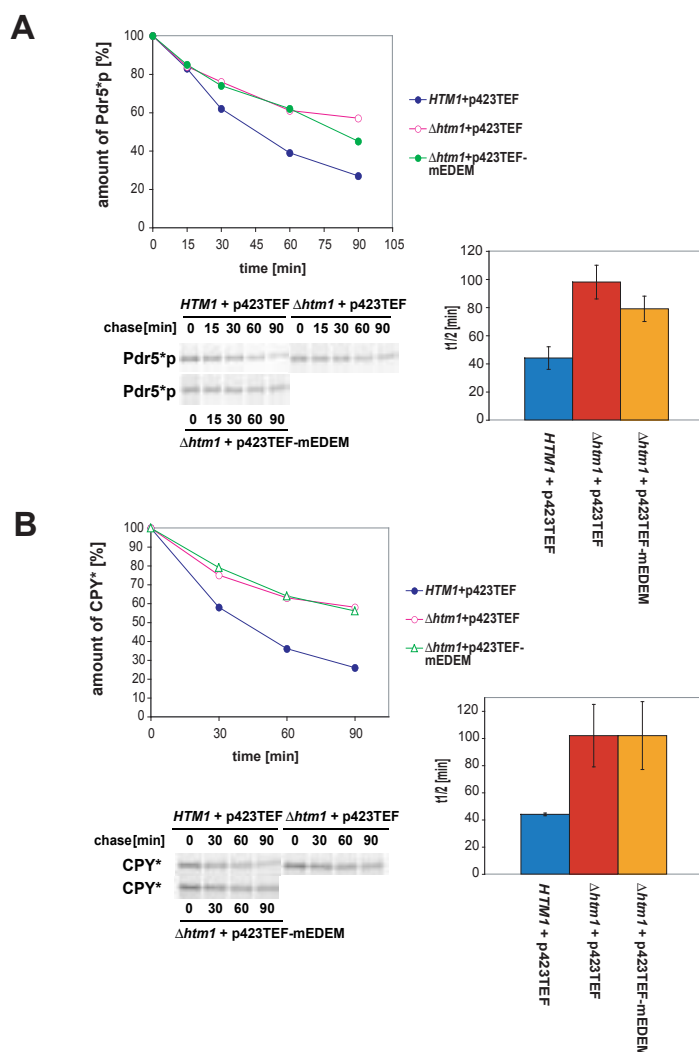
Für die folgenden *Pulse Chase*-Experimente wurde mEDEM zunächst von p413TEF exprimiert und als Negativkontrolle der leere Vektor p413TEF in  $\Delta htm1$  transformiert. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, ist mEDEM tatsächlich in der Lage, die Deletion von *HTM1* zu komplementieren



**Abbildung 16. mEDEM komplementiert den Abbaufekt von CFTR in  $\Delta htm1$ -Stämmen.** Die Hefezellen wurden wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben behandelt. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-*Pulse Chase*-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit von CFTR unter Einfluss von niedrigen Expressionsmengen von mEDEM ( $\Delta htm1$  + p413TEF-mEDEM) und hohen Expressionsmengen von mEDEM ( $\Delta htm1$  + p423TEF-mEDEM) gegen den Leervektor p413TEF ( $\Delta htm1$  + p413TEF) in Minuten. Die Autoradiogramme zeigen Bandenmuster von CFTR in 7%-SDS-Gelen typischer Versuche.

und eine Halbwertszeit des CFTR-Abbaus wieder herzustellen, wie sie dem WT-Stamm entspricht ( $t_{1/2} = \text{ca.}70\text{min}$ ). Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von mEDEM im Vergleich zur Expression von p413TEF-mEDEM zu einer erhöhten Abbaurrate und somit zu einer kürzeren Halbwertszeit des CFTR-Proteins führt, wurde in der gleichen Versuchsreihe mEDEM vom Überexpressionsvektor p423TEF-mEDEM in  $\Delta htm1$ -Hefezellen exprimiert. Die Überexpression von mEDEM zeigte eine identische CFTR-Abbaurrate zu mEDEM, exprimiert von p413TEF-mEDEM und führte somit nicht zu einem verstärkten Effekt auf den Abbau des CFTR-Proteins (Abb. 16).

Es sollte nun geklärt werden, ob mEDEM auch in der Lage ist, den Abbau von Glykoproteinen der Hefe in *HTM1*-deletierten Zellen wieder herzustellen. Dabei sollten gleichzeitig mögliche Unterschiede zwischen löslichen Proteinen und polytopen Transmembranproteinen untersucht werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden das lösliche, mutierte Protein CPY\* und eine mutierte Form des ABC-Transporters Pdr5 (Pdr5\* / *pdr5-26*) als Hefe-ERAD-Substrate in  $\Delta htm1$ -Stämmen mit p423TEF-mEDEM und, zur Kontrolle mit p423TEF exprimiert. Die Ergebnisse in Abbildung 17 zeigen, dass im Vergleich zu CFTR in beiden Fällen kein signifikanter Einfluss

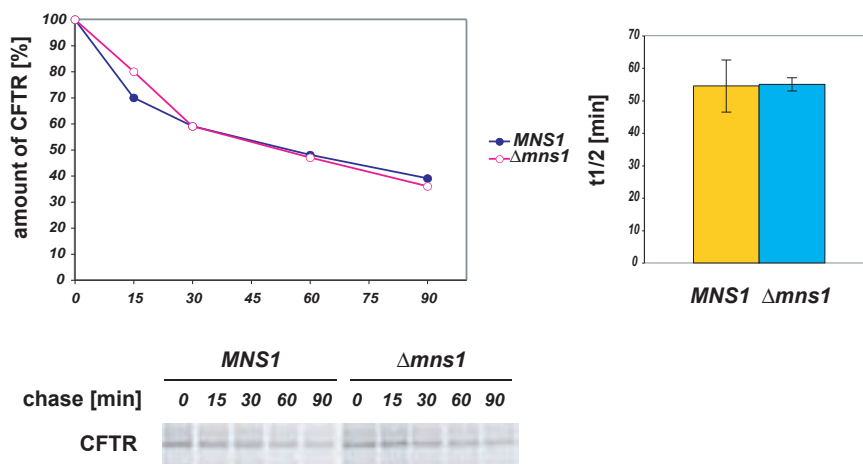


**Abbildung 17. Der Einfluss von mEDEM auf den Abbau der mutierten Hefe-ERAD-Substrate Pdr5\*p und CPY\*.** Die Proben wurden wie in Material und Methoden beschrieben gewonnen. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-Pulse Chase-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit der Hefe-ERAD-Substrate unter Einfluss von mEDEM (p423TEF-mEDEM) gegenüber den den Leervektor p423TEF tragenden Hefezellen in Minuten. Die Autoradiogramme zeigen die Bandenmuster von (A) Pdr5\*p und (B) CPY\* in einem 7%- bzw. 10%-SDS-Gel eines typischen Versuchs.

von mEDEM feststellbar war. Im Falle des Pdr5\*-Abbaus zeigte sich ein leichter Anstieg der Abbaugeschwindigkeit unter dem Einfluss von mEDEM, der allerdings nicht signifikant ausfiel (Abb. 17 A). Für CPY\* konnte keine Beschleunigung des Abbaus festgestellt werden (Abb. 17 B). Die Ergebnisse lassen erkennen, dass mEDEM in Hefezellen zwar vermutlich als Lektin fungieren kann, aber Substratspezifität gegenüber dem glykosylierten Säuger-Membranprotein CFTR zeigt.

## $\alpha$ -1,2-Mannosidase I beeinflusst den Abbau von CFTR in Hefe nicht nachweisbar

Nach bisherigem Verständnis bindet Htm1p an fehlgefaltete Glykoproteine, sehr wahrscheinlich durch die Erkennung der Man8 GlcNAc2-Struktur der Zucker-Grundgerüste, welche über die Abspaltung des Man9-Restes durch das Enzym Mannosidase 1 (Mns1p) entstehen. Demnach sollte die Aktivität von Mns1p Voraussetzung für die Bindung von Htm1p an das abzubauen Protein sein und somit auch Mns1p einen Einfluss auf den CFTR-Abbau zeigen. Nach Jakob *et al.*, 2001 hatte die Deletion von *MNS1* einen leichten aber signifikanten Effekt auf die Abbaurrate von Pdr5\*p. Die hier verwendeten Stämme wurden für Versuche mit CFTR von C. Jakob zur Verfügung gestellt. Sie wurden nach Einführung der zusätzlichen *PDR1-3*-Mutation *Pulse Chase*-Experimenten in Bezug auf CFTR-Abbau unterzogen. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, konnten keine Unterschiede im CFTR-Abbau in Mannosidase I-Wildtyp und Mutantenzellen festgelegt werden. Um Änderungen des genetischen Hintergrunds der Stämme als Ursache für diesen Befund auszuschließen, wurde analog zu  $\Delta htm1$  auch *MNS1* im Stamm YWO 500 über eine Kanamycin-Kassette deletiert. Auch hierbei wurde die Kassette mit flankierenden homologen Bereichen aus dem  $\Delta mns1$ -Stamm der EUROSCARF-Deletionsstammbank mit den Oligonukleotiden  $\Delta mns1\_for$

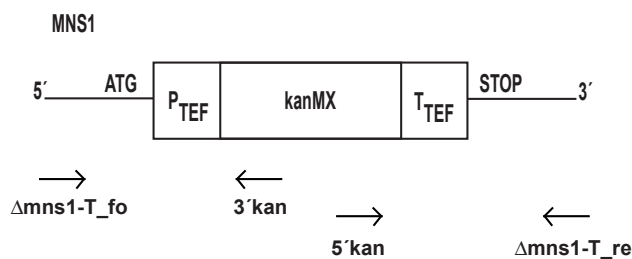


**Abbildung 18. Die Deletion von *MNS1* beeinflusst nicht den Abbau von CFTR.** Die Proben wurden wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-*Pulse Chase*-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit von CFTR in WT (*MNS1*) und Deletionsstamm ( $\Delta mns1$ ) in Minuten. Das Autoradiogramm

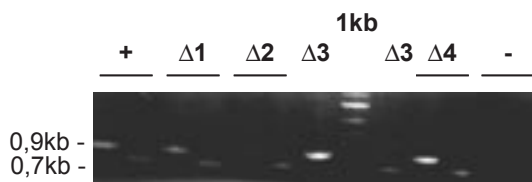
zeigt das Bandenmuster von CFTR in einem 7%-SDS-Gel eines typischen Versuchs. Ein Unterschied in den Abbauraten ist nicht zu erkennen.

und  $\Delta mns1\_rev$  amplifiziert und über Kanamycin-Resistenz und PCR überprüft (Abb 19). Auch diese Stämme zeigten keinen signifikanten Einfluss von Mns1p auf den CFTR-Abbau. Es scheint, dass in Hefe exprimiertes CFTR-Protein unabhängig von diesem Mannose-abspaltenden Prozess abgebaut werden kann. Möglicherweise wird CFTR auch durch eventuell unbekannt weitere Faktoren beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass mEDEM, eventuell auch Htm1p, wie in neuesten Versuchen gezeigt (Molinari *et al.*, 2003), unabhängig von Mns1p fungieren kann und durch Mns1p nur die Effizienz seiner Funktion gesteigert wird. Diese Funktionssteigerung wird nach Molinari *et al.*, 2003 durch die Überexpression von EDEM erzielt. Auch in dieser Studie wurde mEDEM überexprimiert.

A



B



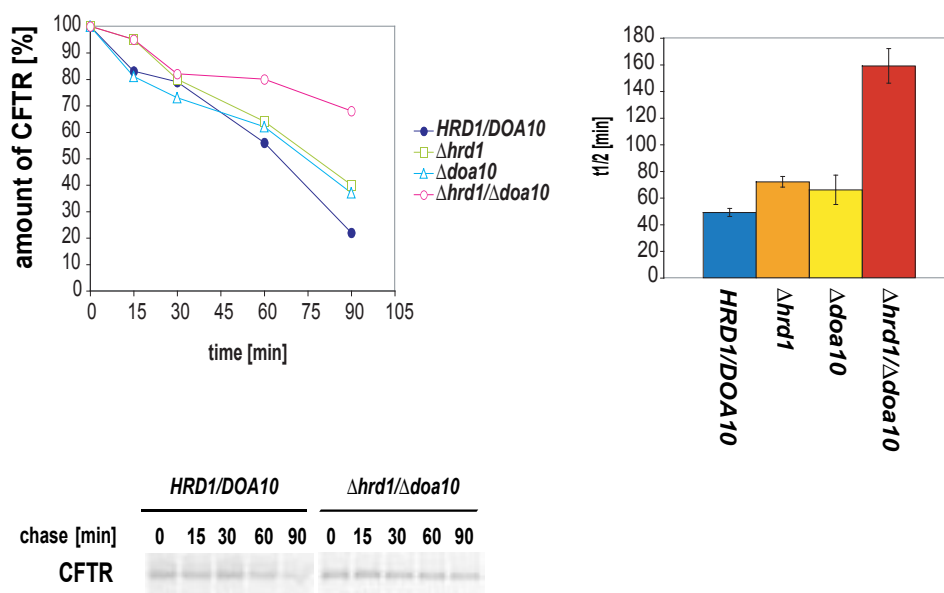
Oligonukleotiden 5'kan (5' cgagtcggaatcgagaccg 3') und  $\Delta mns1-T\_re$  (5' gcattagtcttacggcagcg 3') ein etwa 0,7kb großes Fragment aus der genomischen DNA der Deletionsstämme amplifiziert werden. Während sich Klon  $\Delta 2$  als falschpositiv erwies, zeigten  $\Delta 1$ , 3 und 4 die erwarteten Banden entsprechend der Positivkontrolle (+) und wurden für die weiteren Versuche verwendet.

**Abbildung 19. Deletion von MNS1 über homologe Rekombination mit einer Kanamycin-Kassette.** A. Schema der Deletionskassette. Der größte Teil des ORFs von MNS1 wurde durch diese Kassette ersetzt. Das Kanamycin-Resistenzgen wird von Promotor (P) und Terminator (T) des Hefe-Transkriptions-Elongationsfaktors 1 (TEF) flankiert. B. Überprüfung der Deletion mittels PCR. „+“ steht für die Positivkontrolle, hier der  $\Delta mns1$ -Stamm aus der EUROSCARF-Stammbank, „-“ ist ein Stamm mit MNS1-Gen,  $\Delta 1$  bis  $\Delta 4$  sind Deletionsstämme von YWO 500. Mit Hilfe der Oligonukleotide  $\Delta mns1-T\_fo$  (5' gaagttaattgagttcttaaaccgc 3') und 3'kan (5' gaggcataaattccgctgagcc 3') konnte ein etwa 0,9kb großes Fragment und mit den

## Die Beteiligung von Ubiquitin-Ligasen (E3) am CFTR-Abbau

Polyubiquitinierung von CFTR ist eine Voraussetzung für seinen Abbau durch das Proteasom (Jensen *et al.*, 1995 / Ward *et al.*, 1995). Das konnte sowohl im Säugersystem als auch in der Hefe gezeigt werden. Die Polyubiquitinierung von CFTR in Hefe benötigt die E2-Enzyme Ubc6p und Ubc7p (Kiser *et al.*, 2001 / Zhang *et al.*, 2001). Der letzte Schritt der Ubiquitin (Ub)-Übertragung wird entweder direkt oder vermittelt von E3-Ubiquitin-Ligasen durchgeführt. Die E3-Enzyme galten ursprünglich als sehr substratspezifisch, was sie gerade für die Untersuchungen an CFTR interessant machte, da sie eine Möglichkeit der spezifischen Beeinflussung des ERAD zu sein schienen, ohne das Gesamtsystem nachhaltig zu stören. Mittlerweile wurde sowohl von

dem Hsp70/Hsc70-Co-Chaperon CHIP (Meacham *et al.*, 2001) als auch von SCF<sup>Fbx2</sup>, einem E3-Komplex (Yoshida *et al.*, 2002) berichtet, dass sie in Zellkultur eine E3-Funktion auf den CFTR-Abbau ausüben können. Allerdings zeigte keines der beiden E3-Enzyme einen starken Effekt auf den Abbau von CFTR. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Ubiquitinierungsmechanismus von CFTR von verschiedenen Enzymen mit überlappender Spezifität abhängig ist. In Hefe wurden Messungen zum Einfluss des lange bekannten E3-Enzyms Der3p/Hrd1p auf den Abbau von CFTR unterschiedlich interpretiert (Kiser *et al.*, 2001 / Zhang *et al.*, 2001). Um die Frage des Einflusses von Der3p/Hrd1p auf CFTR zu klären, wurde der Abbau von CFTR in einem  $\Delta hrd1$ -Stamm untersucht. Die Deletion führte zu einer leichten aber signifikanten Verlangsamung des Abbaus von CFTR (Abb. 20). In Parallelversuchen wurde die Frage gestellt, ob Doa10p (Swanson *et al.*, 2001), ein zweites, neu identifiziertes E3, eine Funktion auf den CFTR-Abbau hat. Wie in Abb. 20 zu sehen ist, hat die Deletion von *DOA10* einen leichten, zu  $\Delta hrd1$  vergleichbaren Einfluss auf den Abbau von CFTR. Weitere Parallelversuche mit einem Doppeldeletionshefestamm  $\Delta hrd1/\Delta doa10$  führten zu einer gegenüber den Einzeldelationen von  $\Delta hrd1$  und  $\Delta doa10$  deutlich gesteigerten Verlangsamung des CFTR-Abbaus (Abb. 20). Offenbar besitzen Der3p/Hrd1p und Doa10p überlappende oder ergänzende Funktionen, zumindest in Bezug auf den Abbau von CFTR. Der durch die Deletion von *DER3/HRD1* und *DOA10* nur teilweise blockierte Abbau von CFTR lässt die Frage nach weiteren E3-Enzymen für den CFTR-Abbau offen.

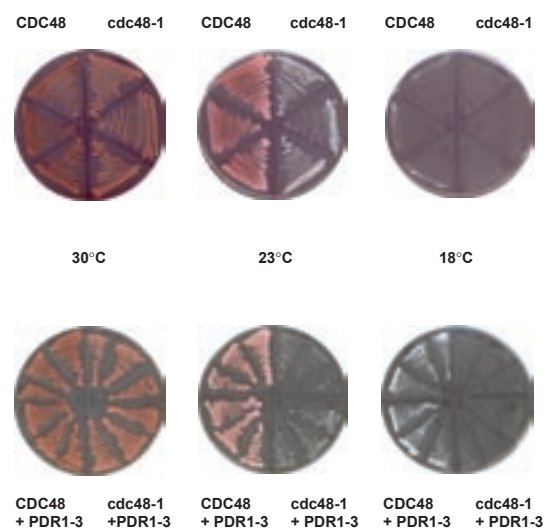


**Abbildung 20. Die E3-Enzyme Hrd1p und Doa10p zeigen Einfluss auf den Abbau von CFTR.** Die Proben für die *Pulse Chase*-Experimente wurden wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben gewonnen. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-*Pulse Chase*-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit des CFTR-Proteins in Minuten. Die Einzeldelationen von *DER3/HRD1* ( $\Delta hrd1$ ) und *DOA10* ( $\Delta doa10$ ) führen zu einer leichten, aber signifikanten Verlangsamung des Abbaus von CFTR. Die Doppeldeletion  $\Delta hrd1/\Delta doa10$  verstärkt den Stabilisierungseffekt deutlich.

## Der Cdc48-Proteinkomplex ist an der Extraktion der polytopen Transmembranproteine CFTR und Pdr5\*<sub>p</sub> aus der ER-Membran beteiligt

CFTR ist ein polytopes Transmembranprotein, das cotranslational in die ER-Membran inseriert wird. Der Rücktransport in das Zytosol (Retrotranslokation) für den nachfolgenden Abbau durch das Proteasom wird durch einen das Sec61-Translokonprotein enthaltenden Komplex sowohl in Säugerzellen als auch in Hefe vermittelt (Bebök *et al.*, 1998 / Kiser *et al.*, 2001). Über den Weg des CFTR-Proteins von der ER-Membran zum Proteasom ist noch nichts bekannt. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass der Abbau verschiedener ERAD-Substrate in Hefe, sowie der MHC-Klasse I Komplex in Säugerzellen von der Funktion eines trimeren Proteinkomplexes bestehend aus der AAA-ATPase Cdc48 (p97), sowie den Proteinen Ufd1p und Npl4p abhängig ist. Dieser Komplex ist offensichtlich für die Freisetzung dieser Proteine von der ER-Membran notwendig (Bays *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Chevalier and Johnson, 2003; Taxis *et al.*, 2003).

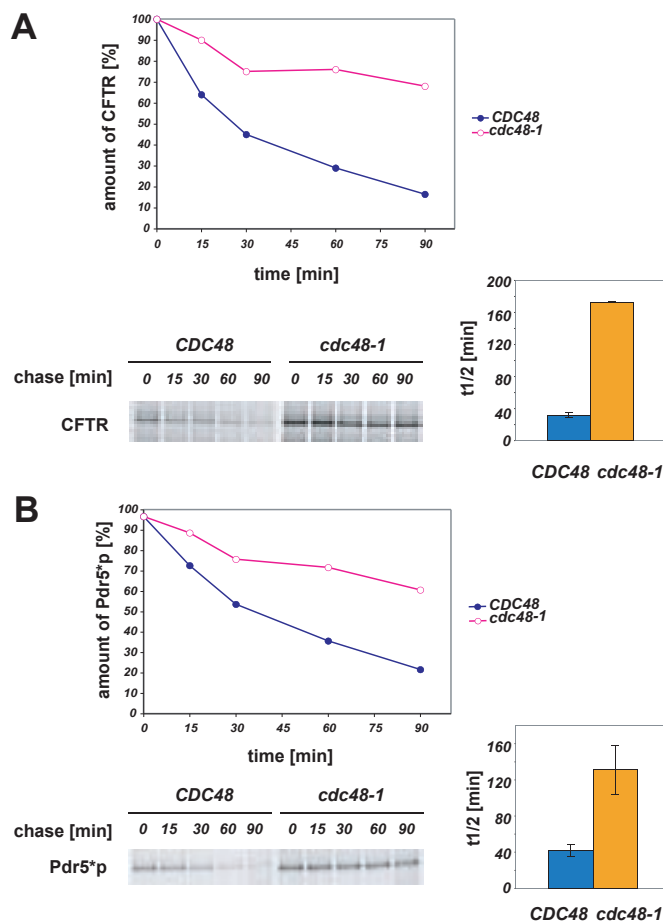
Bisher wurde der Einfluss dieses Komplexes auf polytope Transmembran-Substrate nicht untersucht. Daher wurde sein Einfluss auf den Abbau von CFTR und seinem strukturverwandten Hefe-Homolog Pdr5p in *Pulse Chase*-Experimenten untersucht. *CDC48* WT und *cdc48-1* Mutantenstämme mit benötigten Auxotrophiemarkern wurden durch Kreuzung des *cdc48-1*-Stammes DBY 2030 (Fröhlich *et al.*, 1991) mit W303-1B gewonnen. Die daraufhin verwendeten Stämme stammten aus einer Tetrade und zeigten die gewünschten Auxotrophien und Phänotypen.



**Abbildung 21. Der Hefestamm *cdc48-1* ist kältesensitiv (c<sub>s</sub>).** Hefezellen des WT-Stammes *CDC48* und des Mutantenstammes *cdc48-1* wurden ohne (1. Reihe) und mit (2. Reihe) *PDR1-3*-Mutation bei 25°C, 23°C und 18°C auf Kulturplatten angezogen. In beiden Fällen ist bei 23°C in den *cdc48-1*-Stämmen deutlich vermindertes Wachstum zu erkennen, was auf dem c<sub>s</sub>-Phänotyp des Stammes beruht. Bei 18°C ist kein Wachstum mehr zu erkennen, während der WT-Stamm noch vermindertes Wachstum zeigt.

Der *cdc48-1*-Phänotyp ist Kälte-sensitiv ( $c_s$ ) und wächst nicht mehr bei Temperaturen unter 23°C. Dieser Phänotyp kann auf Medienplatten bei den entsprechenden Temperaturen leicht überprüft werden (Abb. 21). WT und Mutantenstamm wurden bei 25°C (permissive Temperatur) und 23°C (semipermissive Temperatur) kultiviert.

Der Einfluss der *cdc48-1*-Mutation auf den Abbau von CFTR und Pdr5\**p* wurde in *Pulse Chase*-Experimenten über 90 Minuten getestet. Schon bei der permissiven Temperatur von 25°C war eine signifikante Verlangsamung des Abbaus beider ERAD-Substrate zu erkennen (nicht gezeigt), der durch Inkubation bei der semipermissiven Temperatur von 23°C weiter abnahm (Abb. 22 A). Die Halbwertszeit von CFTR verlängerte sich von 32min im Wildtyp auf 173min im Mutantenstamm. Untersuchungen mit Pdr5\**p* zeigten Variationen der Halbwertszeit zwischen 42min für den WT und 131min für den *cdc48-1*-Mutantenstamm (Abb. 22 B). Da die Halbwertszeiten für beide Proteine sowohl im WT als auch in der Mutante sich im gleichen Rahmen bewegen, scheint die Hefe nicht zwischen dem eigenen und dem heterolog exprimierten Transmembranprotein zu unterscheiden.



**Abbildung 22. Die AAA-ATPase Cdc48p ist am Abbau der polytopen Transmembranproteine CFTR und Pdr5\**p* beteiligt.** Die Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben behandelt, mit der Ausnahme, dass die Zellen mit dem Wechsel in Hungermedium bei der semipermissiven Temperatur von 23°C inkubiert wurden. A. Die Bilder zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik mehrerer 90min-*Pulse Chase*-Experimente in Prozent und die durchschnittliche Halbwertszeit von CFTR im WT-Stamm (*CDC48*) und im Mutationsstamm (*cdc48-1*) in Minuten. Das Autoradiogramm zeigt das Bandenmuster von CFTR in einem 7%-SDS-Gel eines typischen Versuchs. B. wie A. für den mutierten Hefe-ABC-Transporter Pdr5\**p*, der als polytopes Transmembranprotein der Hefe ein Substrat von ERAD ist (Plempner *et al.*, 1998).

Der Einfluss von Cdc48p auf den Abbau von CFTR sollte durch *Pulse Chase*-Experimente mit einem Stamm, der einen Defekt in einer weiteren Komponente des trimeren Cdc48-Komplexes trägt, Ufd1p, verifiziert werden. Der Mutantenstamm *ufd1-1* besitzt keinen offensichtlichen Phänotyp, der die Mutation belegen könnte. Sie führt aber zu einer Verlangsamung des Abbaus der CPY\* (Jarosch *et al.*, 2002), was sich in CHX-Chase-Experimenten nachweisen lässt (Abb. 23).

**Abbildung 23. Der Hefestamm mit der Mutation *ufd1-1* verlangsamt den Abbau von CPY\*.** In einem 90min CHX-Chase wurde der Abbau von CPY\* in den Stämmen *UFD1* und *ufd1-1* ohne und mit *PDR1-3*-Mutation(+) *PDR1-3* überprüft. Proben wurden zu den Zeitpunkten t=0; 15; 30, 60 und 90min genommen. Die Proben wurden über 10% SDS-Gele aufgetrennt und im Semi Dry Blot auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Da CPY\* mit einem HA-Epitop versehen war, wurde das Protein mit  $\alpha$ HA-AKS (Babco/Covance) detektiert. Für den Chemilumineszenznachweis wurde das ECL-System von Amersham-Pharmacia verwendet. Der CPY\*-Abbau zeigt sich in *ufd1-1*-Stämmen verlangsamt. Dieser Effekt wird nicht durch die Einführung der *PDR1-3*-Mutation beeinflusst.

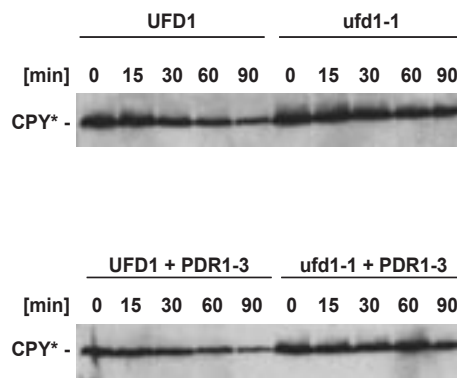
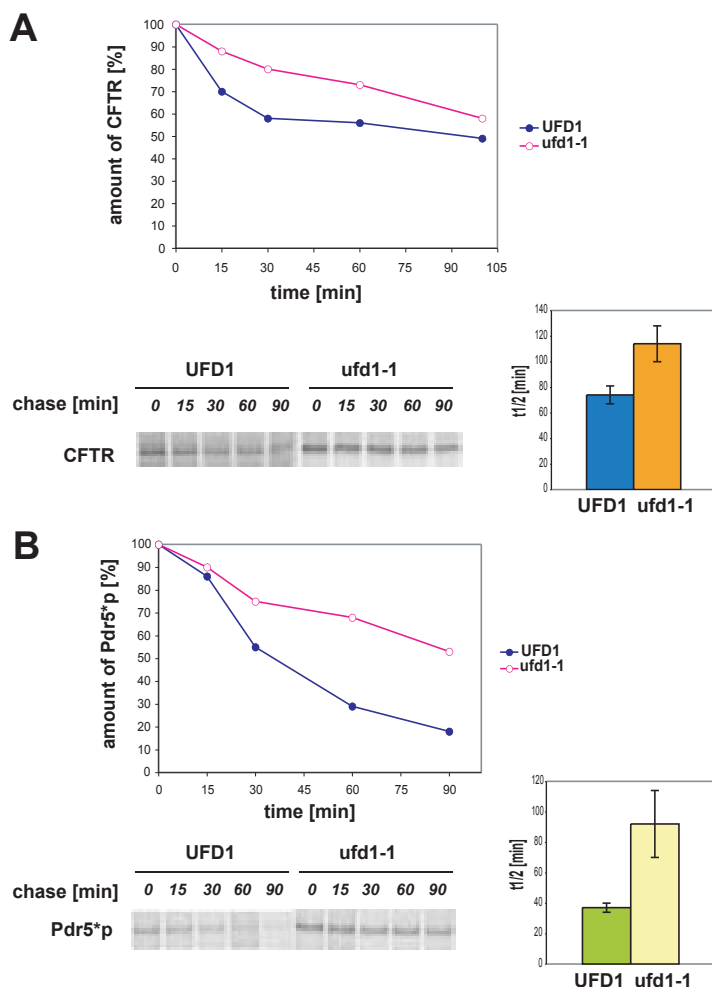


Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der *Pulse Chase*-Experimente von CFTR (A) und Pdr5\*p (B) in *UFD1*-Wildtyp und *ufd1-1*-Mutante. Wie erwartet verlangsamt die Mutation *ufd1-1* sowohl den Abbau von Pdr5\*p als auch von CFTR. Allerdings fällt die Verlangsamung des Abbaus von CFTR schwächer aus als in den Versuchen mit der *cdc48-1*-Mutante. Dennoch ist der Effekt signifikant. Der Einfluss der *ufd1-1*-Mutation auf den Abbau von Pdr5\*p ist vergleichbar mit dem



**Abbildung 24. Die *ufd1-1*-Mutation führt zu signifikanter Verlangsamung des Abbaus von CFTR und Pdr5\*p.** Die Stämme wurden in *Pulse Chase*-Experimenten untersucht, wie zuvor beschrieben. A. Die Graphen zeigen die durchschnittliche Abbaukinetik von CFTR in einem 100min Pulse Chase und die durchschnittliche Halbertzeit  $t_{1/2}$  in Minuten in WT- (*UFD1*) und Mutanten-Stämmen (*ufd1-1*). Das Autoradiogramm eines 7% SDS-Gels zeigt ein typisches Ergebnis. B. wie A. für den mutierten Hefe-ABC-Transporter Pdr5\*p.



in der *cdc48-1*-Mutante gefundenen. In Analogie zur bekannten Funktion des Cdc48-Komplexes auf die Freisetzung von CPY\* aus dem ER legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass sowohl CFTR als auch Pdr5\*<sub>p</sub> nicht direkt vom Proteasom aus der ER-Membran gezogen werden, sondern über den trimeren Cdc48-Proteinkomplex.

## Diskussion

Der rasche Abbau von mutiertem  $\Delta F508$ -CFTR im Menschen stellt ein wesentliches Problem dar, welches zur Krankheit Mukoviszidose führt. Die genauen Mechanismen und die beteiligten Faktoren, die über das Schicksal dieses wie auch anderer verwandter Proteine, also über deren Reifung oder Abbau entscheiden, sind zum großen Teil noch immer unbekannt. Die hier vorgelegten Studien haben neue Aufschlüsse bezüglich des Abbaus von humanem CFTR in Hefe geliefert. Dadurch belegen sie in deutlicher Weise, dass der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* bestens geeignet ist, gerade die Prozesse der Qualitätskontrolle und des ERAD, auch in Bezug auf Proteine höherer Eukaryoten, zu untersuchen. Die beteiligten Komponenten sowie die Mechanismen können deshalb in diesem Modellsystem schnell entschlüsselt werden.

In dieser Arbeit wurde das humane CFTR-Gesamtprotein in Hefezellen exprimiert. Die cDNA des CFTR-Gens wurde zwischen dem Promotor und dem Terminator eines strukturverwandten Hefegens, des ABC-Transporters *PDR5*, auf einem Plasmid integriert. Da die Expressionsmengen des so exprimierten heterologen CFTR-Proteins sehr gering waren, wurde in allen CFTR-exprimierenden Stämmen eine *pdrl-3*-Mutation eingeführt. Diese führte zu einer Funktionssteigerung des Transkriptionsfaktors Pdr1p, welcher unter anderem die Transkription unter dem *PDR5*-Promotor stehender Gene und somit auch die CFTR-Expression derart steigert, dass das Protein immunologisch nachweisbar wird (Kiser *et al.*, 2001). Weiterhin konnte die Proteinmenge durch gesenkte Kultivierungstemperaturen der Hefekulturen gesteigert werden. Hierfür dürften zwei Gründe eine Rolle spielen. Zum einen ist bekannt, dass *PDR5* bei niedrigeren Temperaturen verstärkt transkribiert wird. Zum zweiten wird CFTR in Säugerzellen durch niedrigere Kultivierungstemperaturen stabilisiert und kann unter diesen Bedingungen sogar als mutiertes  $\Delta F508$ -CFTR-Protein in geringem Maße zur apikalen Plasmamembran transportiert werden. Bezüglich der Gewinnung des Proteins aus Hefezellen zeigte sich, dass es sehr wichtig war, Zellproben während des Glasperlensaufschlusses nicht mit SDS zu versetzen. Dies sollte zwar die Membransolubilisierung fördern, zeigte aber in Verbindung mit der bei dem Aufschluss entstehenden Wärme dramatische Reduktion der Menge des nachzuweisenden Proteins. Generell wirkte sich Kühlung der Proben vorteilhaft auf den Nachweis des CFTR-Proteins aus. Die Aussagekraft des Versuchsmodells Hefe wurde in *Pulse Chase*-Experimenten in Hefestämmen mit Deletionen der Ubiquitin konjugierenden E2-Enzyme Ubc6p und Ubc7p belegt. Diese beiden Enzyme gelten als zwei zentrale Komponenten des Ubiquitinierungssystems, deren Säugerhomologe mittlerweile gefunden werden konnten. Die Hefemutanten, denen *UBC6* und *UBC7* fehlen, zeigen eine deutliche Verlangsamung des Abbaus von CFTR. Dies ist konform zu den Beobachtungen von Kiser *et al.* (2001). Beide E2-Enzyme spielen demnach eine wichtige Rolle im Abbauprozess von CFTR.

Um nun Aussagen über den Einfluss von Komponenten der Qualitätskontrolle und des ERAD auf den Abbau von CFTR treffen zu können, wurde der CFTR-Abbau in verschiedenen Hefe-Mutanten mit neu identifizierten Faktoren von Qualitätskontrolle und ERAD untersucht. Einer dieser Faktoren ist das Hefe-Lektin Htm1p und sein Säugerhomolog EDEM. Beide sind notwendige Komponenten des Abbaus von löslichen oder Membran-integrierten Glycoproteinen. In dieser Studie wurde der Einfluss dieser Lektine auf CFTR in Hefe untersucht. Die Deletion des hefeeigenen *HTM1* in Hefezellen führte zu einer unvollständigen, aber signifikanten Stabilisierung des Proteins. Somit wird offenbar auch das heterologe Glykoprotein CFTR von diesem Lektin erkannt und dem Abbau zugeführt. Dass der Einfluss des Lektins wie auch bei anderen Hefeproteinen wie Pdr5\**p* beobachtet, keinen sehr starken Effekt auf den Abbau ausübt, kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte die Funktion des Lektins lediglich in einer Zurückhaltung von Glykoproteinen mit einer bestimmten Kohlehydratstruktur (Man8GlcNAc2) bestehen, die keine wesentliche Verbindung zum Abbauprozess besitzt. Dieser könnte weitestgehend unabhängig vom Glykosylierungsgrad eines Glykoproteins durch andere Signale ausgelöst werden. Möglich wäre auch das Vorhandensein weiterer Lektine, die neben Htm1p Proteine anhand der Struktur ihrer Glykosylierungsstellen binden und dem Abbau zuführen. Zur Zeit sind allerdings keine solchen Lektine bekannt.

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob das Htm1p-homologe Säugerprotein mEDEM die Funktion des deletierten Htm1p-Proteins ersetzen kann. Hierfür wurde mEDEM im *Δhtm1*-Deletionsstamm exprimiert. Es zeigte sich interessanterweise eine vollständige Komplementierung des Abbaufektes. Die Halbwertszeit des CFTR-Proteins entsprach durch die Expression des mEDEM-Proteins im *Δhtm1*-Stamm der Halbwertszeit von CFTR im WT-HTM1-Stamm. Diese Ergebnisse zeigen, dass EDEM Htm1p funktionell ersetzen kann und belegen die enge Verwandtschaft von Hefe- und Säugersystem in ihren zellbiologischen Grundlagen. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass die Glykosylierung vermutlich auch in menschlichen Zellen Einfluss auf die Qualitätskontrolle und den Abbau von CFTR hat. Entgegen Erkenntnissen aus Säugerzellen (Molinari *et al.*, 2003) führte die Überexpression von mEDEM in Hefezellen im Vergleich zu mEDEM, welches von einem zentromerischen Expressionsvektor translatiert wurde, nicht zu gesteigerten Abbauraten von CFTR. Es scheint, dass die Konzentration des vom zentromerischen Vektor gebildeten mEDEM in Hefezellen ausreicht, das gesamte vorliegende Kohlehydratrest-prozessierte CFTR zu binden.

Für das hefeeigene ERAD-Substrat Pdr5\**p* führte die Expression von mEDEM in *Δhtm1*-Zellen nur zu einer sehr geringen und nicht signifikanten Suppression des *Δhtm1*-Defektes. Der Abbau des löslichen Hefe-ERAD-Substrates CPY\* wurde von mEDEM überhaupt nicht beeinflusst. Diese leichten Unterschiede in der Affinität von mEDEM gegenüber Pdr5\**p* und CPY\* in *HTM1*-deletierten Zellen könnte auf unterschiedlichen Bindungseigenschaften dieser beiden Glykoproteine zu mEDEM beruhen. Im Falle des löslichen Proteins CPY\* könnte eventuell ein zusätzlicher bisher nicht identifizierter Faktor das Protein an das membranständige Htm1p koppeln, an den eine dann auch für mEDEM nötige Bindung aber nicht möglich ist. Andererseits könnte

auch mEDEM einen spezifischen Kopplungsfaktor zur Bindung löslicher Proteine benötigen, der in Hefe nicht vorhanden ist.

Es wird angenommen, dass Htm1p und EDEM die Man8GlcNAc2-Struktur der Zuckerketten erkennen, wie sie nach Abspaltung von Mannose 9 durch die  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I entstehen und nachfolgend diese Proteine an diesen Oligosaccharidgrundgerüsten binden und so der Retrotranslokation zuführen. Entsprechend müsste die Deletion der Mannosidase 1 ebenfalls einen Einfluss auf den Abbau von CFTR zeigen. In zwei verschiedenen Deletionsstämmen mit deletierter  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I konnte allerdings kein messbarer Einfluss festgestellt werden. Dieser Befund steht in Gegensatz zu Untersuchungen mit Pdr5\*<sub>p</sub>, welches in  $\Delta$ *mns1*-Hefestämmen zumindest eine leichte Verlangsamung seines Abbaus zeigte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre das Vorhandensein eines bislang nicht identifizierten Proteins mit einer der Mannosidase I analogen Wirkweise. Möglicherweise finden sich, wie in anderen Prozessen gezeigt, auch im Kohlehydrat-*Trimming*-Prozess unterschiedliche Enzyme mit redundanten oder sich ergänzenden Funktionen, aber abweichenden Substratspezifitäten. Eventuell ist die Prozessierung der Kohlehydratketten durch  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I, zumindest bei manchen Substraten, nicht Voraussetzung für die Bindung der Lektine Htm1p bzw. EDEM. Molinari *et al.* (2003) berichteten, dass EDEM bereits vor dem Abspalten des Mannose 9-Restes durch  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I Einfluss auf Glykoproteine nimmt. Seine Funktion wird aber infolge der Einwirkung von  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I verstärkt, bzw. optimiert.

Für den proteasomalen Abbau fehlgefalteter Proteine ist die Markierung mit Polyubiquitinketten eine Grundvoraussetzung. Diese Polyubiquitinierung wird durch Ubiquitin-konjugierende E2-Enzyme und Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3s) vermittelt. Von den zwei E3-Enzymen CHIP und SCF<sup>Fbx2</sup> wurde berichtet, dass sie zumindest zum Teil den Abbau von CFTR in Säugerzellen beeinflussen können (Meacham *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2002). Allerdings verminderte CHIP die Ubiquitinierung von  $\Delta$ F508-CFTR nur um 60% und Fbx2 konnte  $\Delta$ F508-CFTR sogar nur um 30% stabilisieren. Daher liegt es nahe, dass E3-Enzyme breitere überlappende Funktionen im Abbauprozess fehlgefalteter Proteine haben und somit verschiedene dieser Enzyme in Kooperation oder unabhängig Einfluss auf den Ubiquitinierungsprozess abzubauenender Proteine nehmen. Ein bekanntes, an ERAD beteiligtes E3-Enzym der Hefe ist Der3p/Hrd1p. Von diesem wurde bereits gezeigt, dass es auf die Ubiquitinierung verschiedener Hefe-ERAD-Substrate unterschiedlich starken Einfluss hat (Bordallo *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1998; Wilhovsky *et al.*, 2000). Bezüglich seines Einflusses auf die Ubiquitinierung von CFTR gab es widersprüchliche Befunde. Daher wurde in dieser Arbeit nochmals der Einfluss der Deletion von *DER3/HRD1* auf den Abbau von CFTR untersucht und dabei eine leichten, aber signifikante Verlangsamung der CFTR-Abbaurrate festgestellt. Die Deletion eines zweiten, neu identifizierten E3-Enzyms der Hefe, Doa10p, zeigte eine vergleichbare leichte Stabilisierung des CFTR-Proteins. Die Doppeldeletion beider E3-Enzyme verstärkte diesen Stabilisierungseffekt sehr deutlich. Dies deutet auf eine Kooperation dieser beiden E3-Enzyme in Bezug auf den CFTR-Abbau hin. Da die Deletion der

beiden E3-Enzyme nur zu einer teilweisen Stabilisierung von CFTR führte, ist es wahrscheinlich, dass weitere E3-Enzyme existieren, die an diesem Prozess beteiligt sind. Alternativ kann natürlich auch das Vorhandensein eines Ubiquitin- und Proteasom-unabhängigen proteolytischen Systems nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Es wurde lange Zeit spekuliert, dass die proteasomalen ATPasen des 19S-Komplexes an der Extraktion des CFTR-Proteins aus der ER-Membran und dem Transport zum Proteasom direkt beteiligt sind (Zhang *et al.*, 2001). Solch eine Extraktionsfunktion wurde auch von Mayer *et al.*, 1998 für ein Deg1-Sec62p-Hybrid-Membranprotein vorgeschlagen. Es ist zumindest belegt, dass Proteasomen direkt mit der zytosolischen Seite der ER-Membran assoziiert sein können (Palmer *et al.*, 1996; Rivett *et al.*, 1992). Allerdings würde man im Falle eines solchen direkten Mechanismus nicht erwarten, in Zellen mit inaktiven Proteasomen Fraktionen ubiquitiniertes Substrate aus dem ER im Zytosol zu finden, wie es für CPY\* in Hefezellen gezeigt werden konnte (Jarosch *et al.*, 2002). Auch im Falle von MHC-Klasse I-Schweren Ketten in Zytomegalovirus (CMV)-infizierten Säugerzellen konnten solche Fraktionen nachgewiesen werden (Suzuki *et al.*, 1994; Wiertz *et al.*, 1996 A and B). Weiterhin deutet das Auftreten von zytosolischen Aggresomen in manchen Säugerzellen mit inaktiven Proteasomen auf eine zusätzliche treibende Kraft an der zytosolischen Oberfläche der ER-Membran für die Extraktion abzubauenen Proteins hin. Diese Funktion könnte von dem zytosolischen trimeren AAA ATPase-Komplex Cdc48-Ufd1-Npl4 erfüllt werden, von dem erst seit kurzem bekannt ist, dass er für die Freisetzung verschiedener ERAD-Substrate aus dem ER, bzw. der ER-Membran notwendig ist (Bays *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Chevalier and Johnson, 2003; Taxis *et al.*, 2003). Der Einfluss dieses trimeren Protein-Komplexes auf den Abbauprozess von polytopen Transmembranproteinen wurde bisher nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der Komplexkomponenten Cdc48p und Ufd1p auf die polytopen ABC-Transporter CFTR und Pdr5p überprüft. Hefestämme mit mutiertem Cdc48p zeigten eine dramatische Verlangsamung des Abbaus von CFTR und seinem Hefe-Homologen Pdr5\*p. Ebenso führte eine Mutation der Komplexkomponente Ufd1p zu vermindertem Abbau von CFTR und Pdr5\*p. Somit legen diese Versuche nahe, dass der trimere Cdc48-Proteinkomplex entscheidend auch für die Freisetzung des CFTR-Proteins aus der ER-Membran ist. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob dieser Komplex abzubauen Proteine direkt an die 19S-UEs des Proteasoms weiterreicht, oder ob weitere Chaperone wie etwa Hsp70/Hsc70 zwischengeschaltet sind und für den Transport und/oder die Protein-Entfaltung benötigt werden.

# Literaturverzeichnis

Alani, E., Cao, L. and Kleckner, N. (1987) *Genetics* **116**: 541-545

Andersson, H., Nilsson, I. and von Heijne, G. (1996) Calnexin can interact with N-linked glycans located close to the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett.* **397**: 321-324

Arnold, S.M., Fessler, L.I., Fessler, J.H. and Kaufmann, R.J. (2000) Two Homologues Encoding Human UDP-Glucose:Glycoprotein Glycosyltransferase Differ in mRNA Expression and Enzymatic Activity. *Biochemistry* **39**: 2149-2163

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

Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capiiaux, E. and Goffeau, A. (1987) The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **262**: 16871-16879

Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L. and Goffeau, A. (1994) PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1\*. *J. Biol. Chem.* **269**: 2206-2214

Barlowe, C. (2002) COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 417-422

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**: 367-380

Bays, N.W., Wilhovsky, S.K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K. and Hampton, R.Y. (2001a) HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitylated ER proteins. *Mol. Biol. Cell* **12**: 4114-4128

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

Bays, N.W. and Hampton, R.Y. (2002) Cdc48-Ufd1-Npl4: Stuck in the Middle with Ub. *Current Biology* **12**: R366-R371

Bebök, Z., Mazzochi, C., King, S.A., Hong, J.S. and Sorscher, E.J. (1998) The mechanism

underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J Biol Chem.* **273**:29873-29878

Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A.L. and Ciechanover, A. (1997) Ubiquitin-dependent Degradation of Certain Protein Substrates *in Vitro* Requires the Molecular Chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.* **272**: 9002-9010

Berkower, C. and Michaelis, S. (1991) Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO J.* **10**: 3777-3785

Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1996) Degradation of subunits of the Sec61pcomplex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **15**: 2069-207

Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278**: 1806-180

Bissinger, P.H. and Kuchler, K. (1994) Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. *J. Biol. Chem.* **269**: 4180-4186

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

Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S. and Jentsch, S. (2002) Role of the ubiquitin-selective CDC48 (UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* **21**: 615-621

Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Cell & Developmental Biology* **10**: 507-513

Caramelo, J.J., Castro, O.A., Alonso, L.G., De Prat-Gay, G. and Parodi, A.J. (2003) UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 86-91

Carvajal, E., van den Hazel, H.B., Cybularz-Kolaczowska, A., Balzi, E. and Goffeau, A.

(1997) Molecular and phenotypic characterization of yeast *PDR1* mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 406-415

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

Chang, X.B., Tabcharani, J.A., Hou, Y.X., Jensen, T.J., Kartner, N., Alon, N., Hanrahan, J.W. and Riordan, J.R. (1993) Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* **268**: 11304-11311

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

Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S. and Hochstrasser, M. (1993) Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell* **74**: 357-369

Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R. and Smith, A.E. (1990) Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell* **63**: 827-834

Chevalier, M.S. and Johnson, D.C. (2003) Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2 cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties. *J. Virol.* **77**: 4731-4738

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

Choo-Kang, L. and Zeitlin, P.L. (2001) Induction of HSP70 promotes  $\Delta$ F508 CFTR trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**: 58-68

Dahlmann, B., Kopp, F., Kristensen, P. and Hendil, K.B. (1999) Identical Subunit topographies of Human and Yeast 20S Proteasomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**: 96-300

Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J.P. and Lazdunski, M. (1991) Altered chloride ion channel kinetics associated with the  $\Delta$ F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**: 526-528



- Deak, P.M., Wolf, D.H. (2001) Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J Biol Chem.* **276**: 10663-10669
- Decottignies, A., Lambert, L., Catty, P., Degand, H., Epping, E.A., Moye-Rowley, W.S., Balzi, E. and Goffeau, A. (1995) Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **270**: 18150-18157
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**: 761-764
- Dujon, B. (1996) The yeast genome project: what did we learn?. *Trends in Genetics* **12**: 263-270
- Editorial (2000) Award for the ubiquitin pathway. *Nature Cell Biology* **2**: E 171
- Egner, R., Rosenthal, F.E., Kralli, A., Sanglard, D. and Kuchler, K. (1998) Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol. Biol. Cell.* **9**: 523-543
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**: 1882-1888
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 181-191
- Elsässer, S., Gali, R.R., Schwickart, M., Larsen, C.N., Leggett, D.S., Müller, B., Feng, M.T., Tübing, F., Dittmar, G.A. and Finley, D. (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol.* **4**: 725-730
- Fagioli, C., Mezghrani, A. and Sitia, R. (2001) Reduction of interchain disulfide bonds precedes the dislocation of Ig- $\mu$  chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* **276**: 40962-40967
- Falcon-Perez JM, Mazon MJ, Molano J, Eraso P. (1999) Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **274**: 23584-23590
- Falnes, P.O. and Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**: 407-413

Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S. and Weissman, A.M. (2001) The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is an ubiquitin protein ligase implicated in the degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14422-14427

Farinha CM, Nogueira P, Mendes F, Penque D, Amaral MD. (2002) The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem J.* **366**: 797-806

Finger, A., Knop, M. and Wolf, D.H. (1993) Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur. J. Biochem.* **218**: 565-574

Friedländer R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, 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. and 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. and Hampton, R.Y. (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J. Cell. Biol.* **151**: 69-82

Gerards, W.L., de Jong, W.W., Boelens, W. and Bloemendal, H. (1998) Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 253-262

Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de La Cruz, F.J. and Römisch, K. (1999) Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell. Biol.* **147**: 1443-1456

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-567

Gottesman, M.M. and Ambudkar, S.V. (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 453-458

- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**: 463-471
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H. and Huber, R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 10976-10983
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H. and Finley, D. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1062-1067
- Haigh, N.G. and Johnson, A.E. (2002 A) Protein sorting at the membrane of the endoplasmic reticulum. In Dalbey, R.E. and von Heijne, G. (eds), *Protein Targeting, Transport and Translocation*. Academic Press, London, UK, pp. 74-106
- Haigh, N.G. and Johnson, A.E. (2002 B) A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol.* **156**: 261-270
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M. and Johnson, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**: 747-758
- Hampton, R.Y., Gardner, R.G. and Rine, J. (1996) Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol. Biol. Cell.* **7**: 2029-2044
- Hampton, R.Y. and Bhakta, H. (1997) Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 12944-12948
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579
- Haynes, C.M., Caldwell, S. and Cooper, A.A. (2002) An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J Cell Biol.* **158**: 91-101
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond,

S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**: 827-834

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

Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D.H. (1997) The Active Site of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. *J. Biol. Chem.* **272**: 25200-25209

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

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

Hicks, J.B. and Herskowitz, I. (1976) Evidence for a new diffusible element of mating pheromones in yeast. *Nature* **260**: 246-248

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

Hirata, D., Yano, K., Miyahara, K. and Miyakawa, T. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* YDR1, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance. *Curr. Genet.* **26**: 285-294

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

Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 405-439

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

Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1986) Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.*

**261:** 2400-2408

Huang, P., Stroffekova, K., Cuppoletti, J., Mahanty, S.K. and Scarborough, G.A. (1996) Functional expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1281**: 80-90

Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. and Takahashi, R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**: 891-902

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. and Reimann, J.D. (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell. Biol.* **10**: 429-439

Jackson, P.K. and Eldridge, A.G. (2002) The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol. Cell* **9**: 923-925

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

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

James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436

Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H. and Sommer, T. (2002) Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat. Cell Biol.* **4**: 134-138

Jensen, T.J., Loo M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L. and Riordan, J.R. (1995) Multiple Proteolytic Systems, Including the Proteasome, Contribute to CFTR Processing. *Cell* **83**, 129-135

Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 42938-42944

- Joazeiro, C.A. and Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**: 549-552
- Johnson, A.E. and VanWaes, 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. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem.* **270**: 17442-17456
- Kaneko, M., Ishiguro, M., Niinuma, Y., Uesugi, M. and Nomura, Y. (2002) Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-induced degradation. *FEBS Lett.* **532**: 147-152
- Kartner, N., Hanrahan, J.W., Jensen, T.J., Naismith, A.L., Sun, S., Ackerley, C.A., Reyes, E.F., Tsui, L.-C., Rommens, J.M., Bear, C.E. and Riordan, J.R. (1991) Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* **64**: 681-691
- Katzmann, D.J., Burnett, P.E., Golin, J., Mahé, Y. and Moye-Rowley, W.S. (1994) Transcriptional control of the yeast PDR5 gene by the PDR3 gene product. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4653-4661
- Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Voet, M., Wysock, W., Golin, J., Volckaert, C. and Moye-Rowley, W.S. (1995) Expression of an ATP binding cassette transporter-encoding gene (*YORI*) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6875-6883
- Kerem, B.-S., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.-C. (1989) Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Gene Analysis. *Science* **245**, 1073-1080
- Kiser, G.L., Gentsch, M., Kloser, A.K., Balzi, E., Wolf, D.H., Goffeau, A. and Riordan, J.R. (2001) Expression and Degradation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **390**: 195-205
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N. (1996) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**: 605-608
- Knop, M., Hauser, N. and Wolf, D.H. (1996) N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast. *Yeast* **12**: 1229-1238

Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L. and Finley, D. (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell.* **7**: 1143-1152

Kostova, Z. and Wolf, D.H. (2002) Protein quality control in the export pathway: the endoplasmic reticulum and its cytoplasmic proteasome connection. In Dalbey, R.E. and von Heijne, G. (eds), *Protein Targeting, Transport and Translocation*. Academic press, London, UK, pp. 180-213

Kostova, Z. and Wolf, D.H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* **22**: 2309-2317

Kunzelmann, K. (1999) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **137**: 1-70

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

Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L. and Pickart C.M. (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**: 763-767

Lashkari, D.A., DeRisi, J.L. MC Cusker, J.H., Namath, A.F., Gentile, C., Hwang, S.Y., Brown, P.O. and Davis, R.W. (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13057-13062

Lenk, U., Yu, H., Walter, J., Gelman, M.S., Hartmann, E, Kopito, R.R. and Sommer, T. (2002) A role for mammalian Ubc6 homologues in ER-associated protein degradation. *J. Cell Sci.* **115**: 3007-3014

Leppert G, McDevitt R, Falco SC, Van Dyk TK, Ficke MB, Golin J. (1990) Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* **125**: 13-20

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. and Masucci, M.G. (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 12616-12621

Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N. and Thomas, P.J. (2003) Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**: 408-411

- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**: 533-539
- Longtine, M.S., McKenzie, A. 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961
- Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B. and Riordan JR. (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.* **17**: 6879-6887
- Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R. and Grinstein, S. (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart ( $\Delta$ F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* **13**: 6076-6086
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J. and Botstein, D. (1987) Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**: 201-216
- Ma, Y. and Hendershot, L.M. (2001) The Unfolding Tale of the Unfolded protein Response. *Cell* **107**: 827-830
- Mahé, Y., Lemoine, Y. and Kuchler, K. (1996) The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. *J. Biol. Chem.* **271**: 25167-25172
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. and Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* **1**: 565-574
- Mayer, T.U., Braun, T. and Jentsch, S. (1998) Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J.* **17**: 3251-3257
- McCracken, A.A. and Brodsky, J.L. (1996) Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell. Biol.* **132**: 291-298
- McNicholas, C.M., Guggino, W.B., Schwiebert, E.M., Hebert, S.C., Giebisch, G. and Egan, M.E. (1996) Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic



fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 8083-8088

Meacham, G.C., Lu, Z., King, S., Sorscher, E., Tousson, A. and Cyr, D.M. (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* **18**: 1492-1505

Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* **3**: 100-105

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

Meyers, S., Schauer, W., Balzi, E., Wagner, M., Goffeau, A. and Golin, J. (1992) Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes *PDR1* and *PDR5*. *Curr. Genet.* **21**: 431-436

Michaelis, S. and Berkower, C. (1995) Sequence comparison of yeast ATP-binding cassette proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **60**: 291-307

Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C. and Botstein, D. (1982) Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**: 547-63

Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**: 90-93

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

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350

Mumberg, D., Müller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**: 597-599

Nadav, E., Shmueli, A., Barr, H., Gonen, H., Ciechanover, A. and Reiss, Y. (2003) A novel mammalian endoplasmic reticulum ubiquitin ligase homologous to the yeast Hrd1. *Biochem.*

*Biophys. Res. Comm.* **303**: 91-97

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

Nilsson, I. and von Heijne, G. (2000) Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* **275**: 17338-17343

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

Oliver, J.D., van der Wal, F.J., Bulleid, N.J. and High, S. (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**: 86-88

Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H. and High, S. (1999) Erp57 Functions as a Subunit of Specific Complexes Formed with the ER Lectins Calreticulin and Calnexin. *Mol. Biol. Cell* **10**: 2573-2582

O'Riordan, C.R., Lachapelle, A.L., Marshall, J., Higgins, E.A. and Cheng, S.H. (2000) Characterization of the oligosaccharide structure associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Glycobiology* **10**: 1225-1233

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. and Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6354-6358

Orr-Weaver, T.L. and Szostak, J.W. (1983) Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 4417-4421

Palmer, A., Rivett, A.J., Thomson, S., Hendil, K.B., Butcher, G.W., Fuertes, G. and Knecht, E. (1996) Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* **316**: 401-407

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

- Parodi, A.J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 69-93
- Patil, C. and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol.* **13**: 349-355
- Pind, S., Riordan, J.R. and Williams, D.B. (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **269**: 12784-12788
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**: 891-895
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K and Wolf, D.H. (1998) Endoplasmic Reticulum Degradation of a Mutated ATP-binding Cassette Transporter Pdr5 Proceeds in a Concerted Action of Sec61 and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* **273**: 32848-32856
- Plempner, R.K., Bordallo, J., Deak, P.M., Taxis, C., Hitt, R. and Wolf, D.H. (1999) Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J. Cell. Sci.* **112**: 4123-4134
- Plempner, R.K., Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci.* **24**: 266-270
- Ploegh, H.L. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**: 248-253
- Poulsen, J.H., Fischer, H., Illek, B. and Machen, T.E. (1994) Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 5340-5344
- Qu, D., Teckman, J.H., Omura, S. and Perlmutter, D.H. (1996) Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 22791-22795
- Quinton, P.M. (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**: 421-422
- Rabinovich, E., Kerem, A., Fröhlich, K.U., Diamant, N. and Bar-Nun, S. (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 626-634

- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H. and Jentsch, S. (2001) Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* **107**: 667-677
- Regeimbal, J. and Bardwell, J.C.A. (2002) Disulfide bound formation in prokaryotes and eukaryotes. In Dalbey, R.E. and von Heijne, G. (eds), *Protein Targeting, Transport and Translocation*. Academic press, London, UK, pp. 131-150
- Rendueles, P.S. and 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
- Rine, J. (1979) Regulation of transposition of cryptic mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. thesis, University of Oregon, Eugene, USA
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B-S, Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L-C. (1989) Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073
- Rivett, A.J., Palmer, A. and Knecht, E. (1992) Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* **40**: 1165-1172
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E. and Goffeau, A. (2001) The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 207-214
- Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Rubenstein, R.C. and Zeitlin, P.L. (2000) Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**: C259-267
- Rutishauser, J. and Spiess, M. (2002) Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med. Wkly.* **132**: 211-222
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J. and Kopito, R.R. (1996) Glycerol Reverses the Misfolding Phenotype of the Most Common Cystic Fibrosis Mutation. *J. Biol. Chem.* **271**: 635-638

Sato, S., Ward, C.L., Kopito, R.R. (1998) Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in vitro. *J Biol Chem.* **273**: 7189-7192

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136

Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. and Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell. Biol.* **148**: 1203-1212

Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R. and Kunzelmann, K. (1999) The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5310-5315

Seufert, W. and Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **9**: 543-550

Shamu, C.E., Story, C.M., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1999) The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate. *J. Cell. Biol.* **147**: 45-58

Shamu, C.E., Flierman, D., Ploegh, H.L., Rapoport, T.A. and Chau, V. (2001) Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 2546-2555.

Sharipo, A., Imreh, M., Leonchiks, A., Branden, C. and Masucci, M.G. (2001) cis-Inhibition of proteasomal degradation by viral repeats: impact of length and amino acid composition. *FEBS Lett.* **499**: 137-142

Sidrauski, C., Brickner, J.H. and Walter, P. (2002) The unfolded protein response. In Dalbey, R.E. and von Heijne, G. (eds), *Protein Targeting, Transport and Translocation*. Academic press, London, UK, pp. 151-179

- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. and Lord, J.M. (1999) Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett.* **459**: 80-84
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209-219
- Sommer, T. and Jentsch, S. (1993) A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* **365**: 176-179
- Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.* **11**: 1227-1233
- Sommer, T., Jarosch, E. and Lenk, U. (2001) Compartment-specific functions of the ubiquitin-proteasome pathway. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **142**: 97-160
- Soni, R., Carmichael, J.P. and Murray, J.A.H. (1993) Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. *Curr. Genet.* **24**: 455-459
- Stutts, M.J., Rossier, B.C. and Boucher, R.C. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J. Biol. Chem.* **272**: 14037-14040
- Suzuki, T., Park, H., Hollingsworth, N.M., Sternglanz, R. and Lennarz, W.J. PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase. *J. Cell. Biol.* **149**: 1039-1052
- Swanson, R., Locher, M. and Hochstrasser, M. (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope / endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Mat $\alpha$ 2 repressor degradation. *Genes & Development* **15**: 2660-2674
- Swanton, E., High, S. and Woodman, P. (2003) Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. *EMBO J.* **22**: 2948-2958
- Szczycka, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D.J. (1994) A yeast metal resistance

protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**: 22853-22857

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

Teem, J.L., Berger, H.A., Ostedgaard, L.S., Rich, D.P., Tsui, L.C. and Welsh, M.J. (1993) Identification of revertants for the cystic fibrosis delta F508 mutation using STE6-CFTR chimeras in yeast. *Cell* **73**: 335-346

Thoreau, V., Berges, T., Callebaut, I., Guillier-Gencik, Z., Gressin, L., Bernheim, A., Karst, F., Mornon, J.P., Kitzis, A. and Chomel, J.C. (1999) Molecular cloning, expression analysis, and chromosomal localization of human syntaxin 8 (STX8). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**: 577-583.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**: 94-102

Tiwari, S. and Weissman, A.M. (2001) Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of T cell receptor subunits. Involvement of ER-associated ubiquitin-conjugating enzymes (E2s). *J. Biol. Chem.* **276**: 16193-16200

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 4350-4354

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

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

Van Oene, M., Lukacs, G.L. and Rommens, J.M. (2000) Cystic Fibrosis Mutations Lead to Carboxyl-terminal Fragments That Highlight an Early Biogenesis Step of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J Biol Chem.* **275**: 19577-19584

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. and Deshaies,

- R.J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**: 611-615
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2001) Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.* **20**: 3124-3131
- Wang, Q. and Chang, A. (1999) Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast. *EMBO J.* **18**: 5972-5982
- Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1994) Intracellular Turnover of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J. Biol. Chem.* **269**: 25710-25718
- Ward, C.L., Omura, S. and Kopito, R.R. (1995) Degradation of CFTR by the Ubiquitin- Proteasome Pathway. *Cell* **83**: 121-127
- Welsh, M.J. and Liedtke, C.M. (1986) Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia. *Nature* **322**: 467-470
- Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S. (1997) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Mol Microbiol* **25**: 683-694
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 13797-13801
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996 a) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**: 432-438
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996 b) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**: 769-779
- Wilhovsky, S., Gardner, R. and Hampton, R. (2000) HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 1697-1708



Xie, Y. and Varshavsky, A. (2000) Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**: 2497-2502

Xiong, X., Chong, E., Skach, W.R. (1999) Evidence that endoplasmic reticulum (ER)- associated degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is linked to retrograde translocation from the ER membrane. *J Biol Chem.* **274**: 2616-2624

Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A. and Wilson, J.M. (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 9480-9484

Yao, T. and Cohen, R.E. (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**: 403-407

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

Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K. and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **418**: 438-442

Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **13**: 2039-2058

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

# Veröffentlichungshinweise und Förderungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen in Vorträgen vorgestellt bzw. in dem angegebenen Artikel veröffentlicht:

## **2002:**

Mukoviszidose-Symposium der Mukoviszidose e.V., Bonn in Düsseldorf

Deutsch-Israelische Projektkooperation (DIP), Berlin

## **2003:**

DFG-Symposium des Schwerpunktes „Ubiquitin-Proteasom-System“, Berlin

Söllerhaus-Meeting, Kleinwalsertal

## **2004:**

DFG-Symposium des Schwerpunktes „Ubiquitin-Proteasom-System“, Berlin

## **Publikation**

Gnann, A., Riordan, J.R. and Wolf, D.H. (2004) CFTR degradation depends on the lectins Htm1p/ EDEM and the Cdc48-complex in yeast. Mol. Biol. Cell - in press

Das Projekt wurde zwei Jahre durch ein Stipendium der Mukoviszidose e.V., Bonn, im Rahmen eines DFG-Projektes und von der Deutsch-Israelischen Projektkooperation (DIP) gefördert.

# Danksagung

Ich danke allen Beteiligten.

Vor allem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. D.H. Wolf, für seine Unterstützung und die anregenden Diskussionen.

PD Dr. med. Joachim Bargon, Frankfurt am Main, für seine uneigennützig Unterstützung.  
Stefan Loitsch, mittlerweile hoffentlich Dr. Loitsch, für eine wunderbare Zeit in Frankfurt, für wissenschaftlichen und psychologischen Beistand und manch erbauende Feldstudie.  
Dem gesamten Labor von PD Dr. J. Arnemann für Unterstützung und Arbeitsfläche.

Dann natürlich allen Kollegen im Institut für Biochemie, Stuttgart, v.a. Dr. Zlatka Kostova, Dr. Karin Hauser und Dr. Reiner Hitt.

Für wissenschaftliche Diskussionen, Notfallhilfe bei Computerproblemen und für die Aufrechterhaltung einer gewissen körperlichen Grundfitness zwischen Alb und Schwarzwald PD Dr. Hans Rudolph.

Allen „Bewohnern“ des Instituts, vor allem „meinem“ Nordlabor vielen Dank für eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, der *Driving Force* - soll ich ihnen dafür danken?

Ganz besonderen Dank und noch ein paar private, hier nicht veröffentlichte Worte an Alexandra. Sie hat mich all die Zeit ausgehalten. Das muss Liebe sein!

*Last and least* meinem Körper, dass er das mitgemacht hat!

# **Erklärung**

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

Stuttgart, 28.06.2004

Andreas Gnann

