

**Die Funktionen von Sec62p und Ssh1p
während der Protein-Translokation
in das endoplasmatische Retikulum
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martin Dünnwald

aus Leverkusen

Köln, 2001

Berichterstatter:

Herr P.D. Dr. N. Johnsson
Frau Prof. Dr. S. Korsching

Tag der letzten mündliche Prüfung: 8.1.2001

Abstract

The split-Ub technique was used to detect the interactions that occur between translocation substrates and constituents of the translocation machinery during translocation across the membrane of the ER in living cells. During translocation, the signal sequence interacts with components of the translocation machinery and brings the attached C_{ub} into close proximity of the N_{ub}-Sec-fusion proteins. As a consequence, N_{ub} and C_{ub} reassemble into native-like ubiquitin and the reporter is cleaved off the C-terminus of C_{ub} by the ubiquitin-specific proteases (Ubps). The extent of this reaction can therefore be used to estimate the proximity between the Sec-proteins and the translocation substrate.

Using the split-Ub technique, it was shown that a translocation substrate bearing the signal sequence of the yeast mating pheromone α -factor interacts preferentially with Sec62p, a component of the tetrameric Sec-complex, which is responsible for posttranslational translocation. Furthermore, a functional characterization of Sec62p was performed, which allowed us to propose that the essential and highly conserved domain at the C-terminus of Sec62p participates in signal sequence recognition. The Ssh1p complex constitutes an alternative Sec-complex in yeast of unknown function. Using the split-Ub technique, I was able to demonstrate that N_{ub}Ssh1p interacts preferentially with translocation substrates bearing the invertase signal. These results suggest that Ssh1p is involved in the translocation of proteins which are channeled across the membrane of the ER via the cotranslational pathway.

Zusammenfassung

Das Split-Ub-System wurde dazu genutzt, die transiente Interaktion eines Translokationssubstrates mit Bestandteilen der Translokationsmaschinerie während des Transportes in das ER in lebenden Zellen nachzuweisen.

Während der Translokation interagiert die Signalsequenz mit Proteinen der Translokationsmaschinerie und bringt das fusionierte C_{ub} in die Nähe der N_{ub}-Sec-Fusionsproteine. N_{ub} und C_{ub} können zum vollständigen Ubiquitin reassoziieren und ein Reporterprotein wird von C-Terminus des C_{ub} durch die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Ubps) abgespalten. Das Ausmaß dieser Reaktion kann zur Abschätzung der Nähe von Sec-Proteinen zu Translokationssubstraten dienen. Mit der Split-Ub-Methode konnte gezeigt werden, dass vorzugsweise Translokationssubstrate mit der Signalsequenz des Paarungspheromones α -Faktor mit Sec62p interagieren. Sec62p ist ein Bestandteil des tetrameren Sec-Komplexes, der für die posttranslationale Translokation verantwortlich ist. Eine funktionelle Charakterisierung des Sec62p erlaubte zudem, einer essentiellen und hochkonservierten Domäne des Proteins eine Rolle bei der Signalsequenzerkennung zuzuschreiben.

Der Ssh1p-Komplex der Hefe stellt einen alternativen Sec-Komplex mit bisher unbekannter Funktion dar. Durch Anwendung des Split-Ub-Systems konnte hier gezeigt werden dass, im Unterschied zu Sec62p Ssh1p mit Translokationssubstraten interagiert, die die Signalsequenz der Invertase tragen. Dies legt nahe, dass Ssh1p an der kotranslationalen Translokation von Proteinen in das ER beteiligt ist.

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	engl. bovine serum albumine, Rindersserumalbumin
C _{ub}	C-terminale Hälfte des Ubiquitin
Ci	Curie
Da	Dalton
Dha	Dihydrofolatreduktase mit HA-Epitop
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Natrium-ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
kb	Kilobasen
KOAc	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithium-Acetat
Lsg.	Lösung
M	mol/l
min	Minute(n)
Mg	Magnesium
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure

MW	realtives Molekulargewicht
NaOAc	Natriumacetat
NEM	N-methylmaleimid
N _{ub}	N-terminale Hälfte des Ubiquitin
N _{ua}	N-terminale Hälfte des Ubiquitin, Alanin an Position 13
N _{ug}	N-terminale Hälfte des Ubiquitin, Glyzin an Position 13
Od _{nm}	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge in Nanometern (nm)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	enhl. phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Ponceau-S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. round per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rura3p	Orothidin-5'-Phosphat-Decarboxylase mit N-terminalem Arginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	engl. synthetic drop out
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxy)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
Ub	Ubiquitin
Ubps	Ubiquitin spezifische Proteasen
UTR	engl. untranslated region
üN	über Nacht
Vol	Volumen
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen

W Watt
WT Wildtyp
W/V Gewicht pro Volumen

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt.

Die Schreibweise der Proteine und Gene richtet sich nach der gängigen Hefenomenklatur.

In der vorliegenden Arbeit werden gängige Fachbegriffe aus dem Englischen übernommen, wenn keine deutsche Entsprechung vorliegt oder nicht gebräuchlich ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die ER-Translokation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.1.1	Die kotranslationale Translokation	3
1.1.2	Die posttranslationale Translokation	4
1.1.3	Der Ssh1p-Komplex	7
1.2	Das Split-Ub-System	7
1.3	Zielsetzung der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien und Enzyme	11
2.2	Antikörper	11
2.3	Kulturmedien	11
2.4	Antibiotika	12
2.5	Bakterienstämme	12
2.6	Hefestämme	12
2.7	Oligonukleotide	14
2.8	Vektoren (Plasmide)	15
2.9	Molekularbiologische Methoden	16
2.9.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	16
2.9.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	17
2.9.3	Enzymatische Behandlung von DNA	18
2.9.3.1	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	18
2.9.3.2	Ligation	18
2.9.4	Kompetente Zellen und Transformation in <i>E. coli</i>	18
2.9.5	Kompetente Zellen und Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	20
2.9.6	Homologe Rekombination	21
2.9.7	Plasmid-Austausch	21
2.9.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.9.9	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.9.10	Elution von DNA aus Agarosegelen	23

2.9.11	Konzentrationsbestimmung von DNA	23
2.9.12	Extraktion von DNA	23
2.9.13	Fällung von DNA	23
2.9.14	Sequenzierung von DNA	24
2.9.15	Konstruktion der verwendeten Vektoren	24
2.9.15.1	Erstellen der Punktmutanten	27
2.9.15.2	Klonierung der NUB-SEC62-Konstrukte	30
2.9.15.3	Klonierung der NUB-SEC62-DHA-Deletionsmutanten	30
2.9.15.4	Klonierung der CUB-Translokationssubstrate	30
2.9.15.5	Klonierung der UB-Translokationssubstrate	30
2.10	Proteinbiochemische Methoden	31
2.10.1	Gesamtproteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	31
2.10.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	31
2.10.2	SDS-PAGE	32
2.10.3	Pulse-Experiment	32
2.10.3.1	Bestimmung der Einbaurrate	33
2.10.3.2	Phosphoimaging	33
2.10.4	Differentielle Zentrifugation	34
2.10.5	Fällung von Proteinen	34
2.10.6	Western-Blot-Analyse	35
2.10.7	Ko-Immunopräzipitation zytosolischer Proteine	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Die Nähe zwischen Sec62p und Proteinen, die in das ER transloziert werden, kann mit dem Split-Ub-System gemessen werden.	37
3.1.2	Die Funktionalität des N _{ub} Sec62p	40
3.1.2	N _{ub} Sec62p und N _{ub} Sec61p zeigen eine spezifische Nähe zum Translokationssubstrat Mf 1-37C _{ub} -Dha	41
3.1.3	Die Quantifizierung der Reaktion von N _{ub} -Fusionsproteinen mit Mf 1-37C _{ub} -Dha	47

3.2	Die Interaktion zwischen Translokationssubstraten und Sec62p wird von der Identität der Signalsequenz beeinflusst	49
3.2.1	N _{ub} Sec62p interagiert mit Mf 1-37C _{ub} -Dha stärker als mit Suc2-23C _{ub} -Dha	49
3.2.2	Ein Wachstumstest zur Untersuchung der Interaktion zwischen Sec-Proteinen und Translokationssubstraten mit Hilfe des Split-Ub-Systems	52
3.3	Die Mutationsanalyse des Sec62p in Bezug auf die Signalsequenz-Erkennung	57
3.3.1	Die Funktionalität der Sec62p-Deletionsmutanten	58
3.3.2	Die Interaktion zwischen N _{ub} Sec62p-Deletionsmutanten und C _{ub} Translokationssubstraten	59
3.3.3	Die Quantifizierung der Interaktion zwischen N _{ub} Sec62p-Deletionsmutanten und Mf 1-37C _{ub} -Dha	62
3.3.4	Der Anstau der Carboxypeptidase Y durch Sec62p-Deletionsmutanten	64
3.4	Die Untersuchung der Sec62p-Homologen anderer Spezies	66
3.4.1	Die Funktionalität der Sec62p-Homologen in <i>S.cerevisiae</i>	67
3.4.2	Die Interaktion der N _{ub} Sec62p aus verschiedenen Spezies mit Mf 1-37C _{ub} -Dha	69
3.5	Die hochkonservierte Domäne des Sec62p C-terminal der zweite Transmembrandomäne	71
3.5.1	Die Sec62p-Mutanten mit einem Austausch an Aminosäureposition 207	71
3.5.1.1	Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q)p sind funktionell	72
3.5.1.2	Die Interaktion zwischen N _{ub} Sec62(R207K)p oder N _{ub} Sec62(R207Q)p und Mf 1-37C _{ub} -Dha	73
3.5.1.3	Der Anstau von ppCPY im Zytosol durch die Punktmutanten Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q)p	74
3.5.1.4	Die Interaktion zwischen Sec62(R207Q)p und Sec63p im Split-Ub-System	76
3.5.2	Die weiteren Punktmutanten des Sec62p	79
3.5.2.1	Die Funktionalität der weiteren Punktmutanten des Sec62p	80
3.5.2.2	Die Expression der Sec62p-Mutanten	81
3.5.2.3	Die Interaktion zwischen N _{ub} Sec62 I p oder N _{ub} Sec62 III p und Mf 1-37C _{ub} -Dha	82
3.5.3	Die Deletionsmutanten Sec62(N206)p und Sec62(218)p	83

3.5.3.1	Die Funktionalität von Sec62(N206) C_{ub} -Dha, Sec62(N218) C_{ub} -Dha, N_{ub} Sec62(N206)Dha und N_{ub} Sec62(N218)Dh	83
3.5.3.2	Die Interaktion zwischen N_{ub} Sec62(N206)Dha oder N_{ub} Sec62(N218)Dha und Mf 1-37 C_{ub} -Dha	85
3.5.3.3	Die zelluläre Lokalisation von Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha	87
3.5.3.3.1	Die differentielle Zentrifugation von Sec62(N206) C_{ub} -Dha	87
3.5.3.3.2	Die Nähe von Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha zu Sec61p, zu Ssh1p oder zu Bos1p gemessen mit dem Split-Ub-System	92
3.5.3.3.3	Der Versuch der Ko-Immunopräzipitation von Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha mit einem zytosolischen Teil des Sec63p	95
3.6	Die Funktion des Ssh1p-Komplexes bei der Translokation von Proteinen in das ER	98
3.6.1	Die Interaktion zwischen N_{ub} Ssh1p und C_{ub} -Translokationssubstraten	98
3.6.2	Die Signalsequenzabhängigkeit der Interaktion zwischen N_{ub} Ssh1p und C_{ub} -Translokationssubstraten	100
3.6.2.1	Die Quantifizierung der Interaktion zwischen N_{ub} Ssh1p und C_{ub} -Translokationssubstraten, die unterschiedliche Signalsequenzen tragen	100
3.6.2.2	Der Reporter Ura3p in der Untersuchung der Signalsequenzabhängigkeit der Reaktion zwischen N_{ub} Ssh1p und den C_{ub} -Translokationssubstraten	102
3.6.3	Die Interaktion zwischen N_{ub} Sbh1p und N_{ub} Sbh2p und C_{ub} -Translokationssubstraten	103
3.6.3.1	Die Funktionalität von N_{ub} Sbh1p und N_{ub} Sbh2p	104
3.6.3.2	Die Interaktion zwischen N_{ub} Sbh1p oder N_{ub} Sbh2p und Mf 1-37 C_{ub} -Dha oder Suc2-23 C_{ub} -Dha	105
3.6.3	Das Ub-System zur Charakterisierung der <i>SSH1</i> -Deletionsmutante	107
3.6.4.1	Das Ub-System	107
3.6.4.1.1	Die verschiedenen Ub-Translokationssubstrate	109
3.6.4.1.2	Die Ub-Translokationssubstrate in ER-Translokationsmutanten	109
3.6.5	Die Translokation des Dap1p in <i>SSH1</i> -Zellen	112
4	Diskussion	114

4.1	Untersuchung transienter Protein-Interaktionen mit dem Split-Ub-System	114
4.2	Die Abhängigkeit des Modus der ER-Translokation von der Hydrophobizität der Signalsequenz	115
4.3	Die biologische Funktion der posttranslationalen Translokation	118
4.4	Die Funktion des Sec62p bei der posttranslationalen Translokation	120
4.4.1	Die funktionellen Domänen des Sec62p	120
4.4.1.1	Die Sec62p-Deletionsmutanten	120
4.4.1.2	Der C-terminale Abschnitt des Sec62p	121
4.4.1.3	Die Punktmutanten des Sec62p	122
4.4.2	Ist Sec62p ein Rezeptor für ER-Signalsequenzen?	122
4.5	Der Ssh1p-Komplex	124
4.5.1	Die Funktion des Ssh1p-Komplexes	126
5	Zusammenfassung	128
6	Literaturverzeichnis	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Erklärung	

1 Einleitung

Ein Charakteristikum eukaryotischer Zellen ist ihre starke Kompartimentierung. Diese gewährleistet eine Vielfalt biologischer Funktionen, die nur durch eine räumliche Separierung möglich wird. Die Kompartimente oder Organellen sind von mindestens einer Membran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, umgeben. Zur Ausführung ihrer spezifischen Aufgaben werden die Kompartimente mit der für sie typischen Ausstattung an Proteinen versehen. Da bis auf wenige Ausnahmen Proteine im Zytosol der Zellen synthetisiert werden, verfügt die Zelle über einen Sortierungsmechanismus, um die spezifische Verteilung. Zu diesem Zweck sind diese Proteine mit einer Signalsequenz ausgestattet, die aus einem oder mehreren Sequenz-Abschnitten besteht (Übersichtsartikel: Nakai, 2000). Signalsequenzen sind für ihr jeweiliges Ziel spezifisch und binden an Rezeptormoleküle. Wie die Signalsequenzen sind auch die Rezeptoren für ihr Organell spezifisch. Nach der Bindung der Signalsequenz an den Rezeptor wird das Protein an den Translokationskanal in der Membran des Organell geführt und die Translokation über oder in die Membran initiiert (Übersichtsartikel: Sabatini *et al.*, 1982; Simon und Blobel, 1993).

In den vergangenen 25 Jahren konnten die grundlegenden Mechanismen der Verteilung von Proteinen und ihres Transportes aufgeklärt werden. Das oben beschriebene allgemeine Modell dieses Prozesses scheint nicht nur für das Erreichen verschiedener Ziele innerhalb und außerhalb einer Zelle, sondern auch für den Proteintransport innerhalb der Zellen verschiedener biologischer Spezies zuzutreffen.

Ein detaillierteres Studium der vielen Transportwege zeigt jedoch wesentliche Divergenzen. So konnten etwa die Arbeiten über den Transport in den Zellkern, in die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER) klären, dass sich die Energetik, die Beschaffenheit der Rezeptor- und Kanalproteine, die mechanistischen Einzelheiten und der Zeitpunkt der Translokation in diese Organellen stark voneinander unterscheiden (Übersichtsartikel: Schatz, 1986).

Eine zentrale Rolle bei der Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle übernimmt das endoplasmatische Reticulum (ER). Alle Proteine, die für den Golgi-Apparat, die Lysosomen oder die Vakuole, die Plasmamembran und die Sekretion bestimmt sind, durchlaufen die Translokation in dieses Kompartiment (Übersichtsartikel: Hong und Tang, 1993; Harter und

Reinhard, 2000). Luminale Proteine werden hier vom intrazellulären Raum (Zytosol) in den extrazellulären Raum transportiert. Alle Membranproteine des sekretorischen Weges werden hier mit der exakten Orientierung ihrer membrandurchspannenden Segmente in die Membran eingebaut (Übersichtsartikel: Blobel, 1980; Mortoglio und Dobberstein, 1995). Um die hohe Transportrate an Proteinen zu gewährleisten, ist das ER mit einer Reihe von Enzymen ausgestattet, die die Reifung von Proteinen katalysieren. Zu diesen Reifungsprozessen zählen das Prozessieren der Signalsequenzen, die Glykosylierung, die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Faltung der luminalen Proteine (Übersichtsartikel: Taylor *et al.*, 1984; Rowling und Freedman, 1993). Gleichzeitig übernimmt das ER eine Qualitätskontrolle der zu transportierenden Proteine. Bevor die Proteine in Vesikeln verpackt das ER verlassen, wird sichergestellt, dass nur richtig gefaltete und modifizierte Proteine ihren weiteren Weg antreten. Nicht korrekt gefaltete oder modifizierte Proteine werden im ER zurückgehalten und wieder ins Zytosol transportiert, wo sie anschließend abgebaut werden (Übersichtsartikel: Pelham, 1989; Brodsky und McCracken, 1999).

1.1 Die ER-Translokation in *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der Erforschung der Translokation von Proteinen in das ER, konnte die Arbeit am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* viele Fragen klären. Hier ist es erstmalig gelungen, die Komponenten der eukaryotischen Translokationsmaschinerie mit Hilfe genetischer und biochemischer Methoden zu identifizieren (Novick *et al.*, 1980; Deshaies und Schekman, 1989; Green *et al.*, 1992; Feldheim und Schekman, 1994). Dabei wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen gefunden, wie Proteine in das ER transloziert werden können. Diese unterscheiden sich nicht nur in der Zusammensetzung der beteiligten Proteinkomplexe, sondern auch in der Art des Transportes zur Membran (Hann und Walter, 1990; Johnsson und Varshavsky, 1994 b; Übersichtsartikel: Brodsky, 1998).

Während bei der kotranslationalen Translokation die Proteine noch während ihrer Synthese in das ER gelangen, ist die Synthese der Proteine bei der posttranslationalen Translokation bereits abgeschlossen, bevor sie in das ER transportiert werden. Die Wahl zwischen den beiden Translokationswegen wird von den Eigenschaften der N-terminalen Signalsequenz bestimmt (Ng *et al.*, 1996). Die ER-Signalsequenz besteht in der Regel aus sechs bis zwölf hydrophoben Aminosäuren, deren Ende durch eine kurze, degenerierte Erkennungssequenz markiert wird (Übersichtsartikel: von Heijne, 1990 a); von Heijne 1990 b)). An der Erkennungssequenz werden die Signalsequenzen nach erfolgter Translokation von

Signalpeptidasen abgetrennt (Achstetter und Wolf, 1985; Übersichtsartikel: Dev und Ray, 1990). Der Grad der Hydrophobizität der Signalsequenz legt das Protein auf einen der beiden Transportmechanismen fest. Bei sehr starker Hydrophobizität wird kotranslational transloziert, während weniger hydrophobe Sequenzen zur posttranslationalen Translokation führen (Ng *et al.*, 1996).

1.1.1 Die kotranslationale Translokation

Sobald ein ausreichend großer Teil der N-terminalen Signalsequenz vom Ribosom in das Zytosol synthetisiert worden ist, bindet der Signal-Erkennungs-Komplex (SRP für „Signal Recognition Particle“) an die naszierende Polypeptidkette (Abb. 1.1, A 1). Das SRP ist ein hochmolekularer Komplex, bestehend aus sieben Proteinen und einem RNA-Molekül (Hann und Walter, 1991; Brown *et al.*, 1994). Ein Protein dieses Komplexes, das Srp54p, wurde als direkter Bindungspartner der Signalsequenz beschrieben (Wiedmann *et al.*, 1987; Zopf *et al.*, 1990; Clemons *et al.* 1999). Während der Bindung des SRP wird die Synthese des naszierenden Polypeptids gestoppt (Nakahara *et al.*, 1994; Mason *et al.*, 2000). Der tertiäre Komplex, bestehend aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP diffundiert zur ER-Membran und wird vom Signalerkennungs-Rezeptor (SRR für „Signal Recognition Receptor“, auch „Docking Protein“ genannt) gebunden (Abb. 1.1, A 2). Der SRR besteht aus zwei Untereinheiten, der membranständigen α -Untereinheit und der β -Untereinheit, die auf der zytosolischen Seite an die α -Untereinheit gebunden ist (Wiedmann *et al.*, 1987; Gilmore *et al.*, 1987 a und b). Am SRR dissoziiert das SRP von der naszierenden Polypeptidkette und dem Ribosom ab und die Translation wird fortgesetzt (Walter und Blobel, 1981 c); Conolly *et al.*, 1991; Conolly und Gilmore, 1993). Erst dann gelangt der nun dimere Komplex zum eigentlichen Translokon in der ER-Membran (Abb. 1.1, A 3). Dieser Protein-Komplex besteht aus den drei Membranproteinen, Sec61p, Sss1p und Sbh1p und wird als trimere Sec-Komplex bezeichnet (Panzner *et al.*, 1995). Sec61p bildet den Kanal, durch den die Proteine in das Lumen des ER oder in die Membran transportiert werden (Simon und Blobel, 1991; Görlich *et al.*, 1992; Crowley *et al.*, 1993; Crowley *et al.*, 1994; Mothes *et al.*, 1994; Hanein *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997). Mit Hilfe seiner zehn Transmembrandomänen schafft das Sec61p eine hydrophile Umgebung inmitten der hydrophoben Membran, durch die die Proteine passieren können (Wilkinson *et al.*, 1996). Die Aufgaben der beiden anderen Proteine des trimeren Komplexes sind weniger gut verstanden. Sss1p ist ein kleines Transmembranprotein, das wie Sec61p für das Wachstum von Hefezellen essentiell ist

(Esnault *et al.*, 1993; Esnault *et al.*, 1994). Sbh1p ist kein für das Wachstum von Hefezellen essentielles Protein. Sbh1p dient vermutlich zur Rekrutierung solcher Proteine an das Translokation, die für Modifikationen, wie die Signalsequenzprozessierung und das Ausbilden von Disulfidbrücken, verantwortlich sind (Hartmann *et al.*, 1994; Kalies *et al.*, 1998). Das an das Translokation gebundene Ribosom setzt die Synthese des Polypeptids fort, das nun durch den Sec61p-Kanal direkt in das Lumen des ER gelangt. Hier finden ebenfalls kotranslationale Modifikationen statt, die der Reifung des Proteins dienen. Dazu zählen die Prozessierung der Signalsequenz, die N-Glykosylierung des Proteins an dafür definierten Stellen, die Ausbildung und Neuverknüpfung von Disulfidbrücken sowie die Bindung an molekulare Chaperone, die die Faltung der Proteine unterstützen (Übersichtsartikel: Taylor *et al.*, 1984). Ist die Synthese des Polypeptids abgeschlossen, diffundiert das Ribosom vom Translokation ab (Übersichtsartikel: Johnson und van Waes, 1995).

Die fortlaufende Synthese des Proteins während der Translokation gibt die Richtung des Transportes in das Lumen des ER vor. Ebenso verhindern die Modifikationen im ER ein Zurückgleiten des translozierten Polypeptids durch den Sec61p-Kanal.

Dieser kotranslationale Transportweg scheint in den Zellen fast aller bisher untersuchten biologischer Spezies vorzukommen (Hartmann *et al.*, 1994). Es wurde auch angenommen, dass die kotranslationale Translokation der einzige oder zumindest der dominierende Transportmechanismus in eukaryotischen Zellen ist. Durch die Arbeiten an *S. cerevisiae* konnte aber ein alternativer Transportweg identifiziert werden. Der Transport der Proteine ins ER findet hier nach ihrer Synthese im Zytosol, also posttranslational statt (Hann und Walter, 1991; Übersichtsartikel: Brodsky, 1998; Johnsson und Varshavsky, 1994 b). Außerdem wird für diesen Transportweg eine andere Ausstattung an Proteinen benötigt als für die kotranslationale Translokation. Von diesen Proteinen ließen sich Homologe in einer Reihe höherer eukaryotischer Organismen finden (Noel und Cartwright, 1994; Daimon *et al.*, 1997; Swennen *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Dies legt den Schluß nahe, dass auch die posttranslationale Translokation einen konservierten Mechanismus für den Transport von Proteinen in das ER darstellt.

1.1.2 Die posttranslationale Translokation

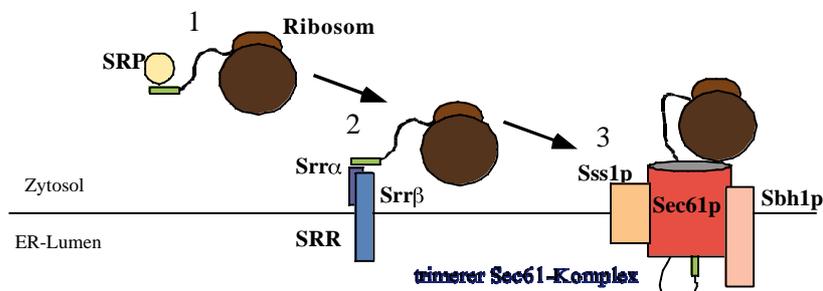
Bei der posttranslationalen Translokation werden die Proteine nach ihrer Synthese im Zytosol von molekularen Chaperonen in einem Zustand gehalten, der den weiteren Transport in das

ER ermöglicht (Abb. 1.1, B 1) (Übersichtsartikel: Zimmerman, 1998; Deshaies *et al.*, 1988). Welche Moleküle hierbei die Aufgabe der Signalsequenzerkennung übernehmen, ist unklar. Es wurden aber Proteine identifiziert, die an diesem Transportprozess beteiligt sind. Zum einen sind dies die Proteine des tetrameren Sec-Komplexes, Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p (Deshaies *et al.*, 1991; Feldheim und Schekman, 1994). Sec62p ist ein Membranprotein, das die Membran zweimal durchspannt und dessen N- und C-Terminus ins Zytosol weisen (Deshaies und Schekman, 1989; Deshaies und Schekman, 1990). Sec63p durchspannt die Membran dreimal, wobei sein N-Terminus in das Lumen des ER ragt, während sich sein C-Terminus im Zytosol befindet (Feldheim *et al.*, 1992). Die luminale Domäne zwischen dem zweiten und dritten Transmembransegment weist eine hohe Homologie zu den konservierten DnaJ-Proteindomänen auf. Diese sind verantwortlich für die Interaktion mit Hitzeschock-Proteinen der Hsp70-Klasse (Übersichtsartikel: Cyr *et al.*, 1999). Auch für das Sec63p konnte mit Kar2p im Lumen des ER ein Protein dieser Proteinfamilie als Bindungspartner identifiziert werden (Scidmore *et al.*, 1993; Lyman und Schekman, 1995; Lyman und Schekman, 1997). Sec71p ist ebenfalls ein Transmembranprotein. Es durchspannt die Membran nur einmal. Sein N-Terminus befindet sich im Lumen des ER und sein C-Terminus im Zytosol (Fang und Green, 1994). Sec71p bindet wahrscheinlich direkt an Sec72p, ein Protein ohne stark hydrophobes Element, das aber durch diese Interaktion mit der Membran fest assoziiert ist.

Die Aufgabe des tetrameren Sec-Komplexes ist weitgehend ungeklärt. Obwohl die Proteine Sec62p und Sec63p essentiell für das Wachstum von Hefezellen sind (Deshaies *et al.*, 1989; Feldheim *et al.*, 1992), konnte ihnen bisher nur teilweise eine Funktion zugewiesen werden. Konditionale Mutanten von Sec62p und Sec63p zeigten, dass diese Sec-Proteine direkt an der Translokation von Proteinen in das ER beteiligt sind. In Hefestämmen, die diese Mutanten als einzige Version der Sec-Proteine exprimieren, wurden Vorläufer von Proteinen, die für den Transport in das ER bestimmt sind, in großer Menge im Zytosol aufgefunden (Deshaies und Schekman, 1987; Rothblatt *et al.*, 1989; Ng *et al.*, 1996). Zu einem ähnlichen, wenn auch deutlich abgeschwächten Phenotyp kommt es auch bei der Deletion der Gene, die für die nicht essentiellen Proteine Sec71p und Sec72p kodieren (Fang und Green, 1994). Ein weiterer Bestandteil der posttranslationalen Translokationsmaschinerie ist der schon bei der kotranslationalen Translokation beschriebene trimere Sec-Komplex. Zusammen mit dem tetrameren Sec-Komplex liegt er in der ER-Membran von Hefezellen häufig als heptamerer Sec-Komplex vor (Abb. 1.1, B 2) (Panzner *et al.*, 1995). Sec61p übernimmt im heptameren Sec-Komplex auch bei der posttranslationalen Translokation die Funktion des Kanals.

Da bei der posttranslationalen Translokation die Synthese des Proteins schon abgeschlossen ist, kann hier das Ribosom nicht die Richtung des Transportes festlegen. Ein anderer Mechanismus muss also verhindern, dass die Proteine während der Translokation ins Zytosol zurückgleiten. Kar2p-Moleküle binden im Inneren des ER fortwährend an die Polypeptidkette, die in das Lumen des ER hineinragt, und blockieren so den Rückweg durch den Sec61p-Kanal. Durch seine Bindung an Kar2p bringt Sec63p dieses Protein in die direkte Nähe des Translokons. Außerdem unterstützt Sec63p das abwechselnde Binden und Lösen des Kar2p an das translozierende Protein, indem es die ATPase Aktivität des Kar2p reguliert. Dieser Mechanismus wird „Brownian Ratchet“ genannt (Matlack *et al.*, 1999).

A Die kotranslationale Translokation



B Die posttranslationale Translokation

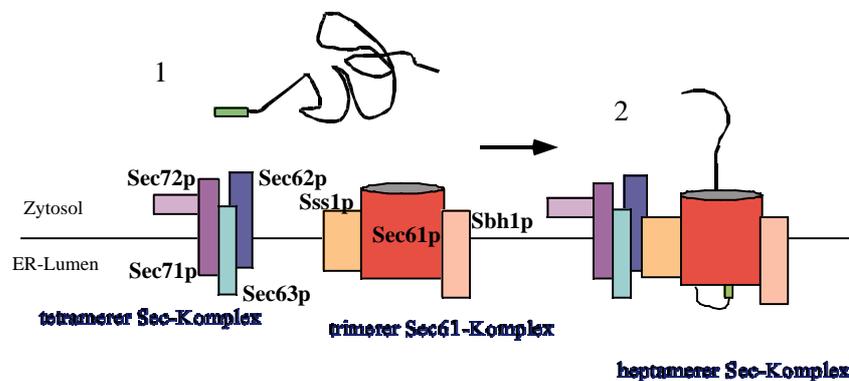


Abb. 1.1 Translokation von Proteinen in das ER. **A** Bei der kotranslationalen Translokation wird die Signalsequenz (grünes Rechteck) des aus dem Ribosom naszierenden Polypeptid vom Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) gebunden (1) und zum membranständigen Signalrezeptor (SRR) gebracht (2). Dieser führt die naszierende Polypeptidkette mit dem Ribosom weiter zum trimeren Sec-Komplex, durch den sie in das Lumen des ER transportiert wird (3). **B** Bei der posttranslationalen Translokation wird das zu transportierende Polypeptid vollständig ins Zytosol synthetisiert (1). Anschließend wird seine Signalsequenz (grünes Rechteck) vom tetrameren Sec-Komplex mit dem trimeren Sec-Komplex, die zusammen den

heptameren Sec-Komplex bilden, erkannt. Es erfolgt der Transport des Proteins durch den trimeren Sec-Komplex in das Lumen des ER (2).

1.1.3 Der Ssh1p-Komplex

In *S. cerevisiae* konnte zusätzlich zu den oben beschriebenen Sec-Komplexen ein weiterer Sec-Komplex identifiziert werden. Dieser besteht aus den Proteinen Ssh1p, Sbh2p und dem im trimeren Sec61-Komplex ebenfalls vorhandenen Sss1p. Ssh1p ist mit Sec61p sequenzverwandt (Finke *et al.*, 1996). Diese Homologie ist aber limitiert. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von Sec61p unterschiedlicher Spezies miteinander, so weisen diese alle eine stärkere Homologie zueinander auf als zu Ssh1p. Die Topologie des Ssh1p scheint jedoch mit zehn Transmembrandomänen der des Sec61p zu gleichen. Ssh1p ist kein essentielles Protein. Hefezellen, die kein Ssh1p exprimieren, weisen nur einen sehr geringen Wachstumsdefekt auf. Wird aber das *SSH1*-Gen in einem Stamm deletiert, der ein temperatursensitives Allel des *SEC61* trägt, *sec61-2*, so ist das Wachstum der Hefezellen sehr stark eingeschränkt. Ob diese Tatsache einen funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen indiziert, konnte noch nicht definitiv festgestellt werden. Das Sbh2p ist dem Sbh1p sehr homolog. Wie Sbh1p ist es nicht essentiell für das Wachstum von Hefezellen. Die starke Verwandtschaft der Proteine führt dazu, dass sie sich gegenseitig ersetzen können. Sbh2p kann, wenn auch nur mit geringerer Affinität, an Stelle von Sbh1 an Sec61p und Sbh1p mit ebenso geringerer Affinität an Ssh1p binden. Eine Doppeldeletion der Gene, die die Sbh-Proteine exprimieren, führt zu einem verlangsamten Wachstum der Hefezellen und zu einem starken Translokationsdefekt (Finke *et al.*, 1996).

Die Funktion des Ssh1-Komplexes konnte bisher nicht geklärt werden.

1.2 Das Split-Ub-System

Mit dem Split-Ub-System entwickelten Johnsson und Varshavsky eine neue Methode zur Untersuchung der Interaktionen und Proximitäten von Proteinen in lebenden Zellen (Johnsson und Varshavsky 1994 a). Hierzu wurden ganz bestimmte Eigenschaften des Ubiquitin-Moleküls ausgenutzt.

Ubiquitin ist ein kompaktes, aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein mit verschiedenen zellulären Funktionen (Vijar-Kumar *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1992; Jentsch und Schlenker, 1995). Beispielsweise markiert Ubiquitin Proteine, die für den Abbau bestimmt sind. Ubiquitin wird in der Zelle in Form von Fusionsproteinen synthetisiert, die von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Ubps) prozessiert werden (Baker *et al.*, 1992; Tobias und Varshavsky, 1994). Diese Fusionsproteine bestehen entweder aus vier aufeinanderfolgenden Ubiquitin-Molekülen (Genprodukt von *UBI4*) oder aus einem Ubiquitin-Molekül, auf das C-terminal ein ribosomales Protein folgt (Genprodukte von *UBI1*, *UBI2* und *UBI3*) (Özkaynak *et al.*, 1987). Die Ubps schneiden C-terminal von Ubiquitin, unabhängig von der Beschaffenheit des folgenden Peptides (Bachmair *et al.*, 1986). Zur Erkennung des Ubiquitins durch die Ubps muß neben einer C-terminalen Erkennungssequenz die korrekte dreidimensionale Struktur des Moleküls vorliegen (Johnsson und Varshavsky, 1994 a)). Durch Beeinträchtigungen in der Faltung oder der Struktur des Ubiquitins kann die Prozessierung durch die Ubps inhibiert oder verlangsamt werden.

Zerlegt man Ubiquitin in zwei etwa gleich große Hälften und exprimiert diese getrennt voneinander, so können sie zusammen finden, um zum kompletten Ubiquitin-Molekül zu reassoziieren. Die N-terminal Hälfte, bestehend aus den Aminosäuren 1-37, wird im Folgenden N_{ub} genannt, die C-terminale Hälfte, bestehend aus den Aminosäuren 35-76, wird C_{ub} genannt. Die Reassoziationsreaktion von N_{ub} und C_{ub} kann in der lebenden Zelle verfolgt werden, indem man ein Reporterprotein an den C-Terminus des C_{ub} fusioniert. Kommen nun die beiden Ubiquitinhälften zusammen, schneiden die Ubps das Reporterprotein vom C_{ub} ab. Somit kommt es durch das Freisetzen des Reporterprotein zu einer Änderung des Molekulargewichtes des Fusionsproteins. Mit einem Antikörper, der gegen den Reporter gerichtet ist, kann diese Reaktion durch Immunopräzipitation oder -Blots nachgewiesen werden.

Durch den Aminosäureaustausch an Position 13 des N_{ub} kann die Affinität zum C_{ub} gezielt vermindert werden. Tritt beispielsweise ein Alanin (N_{ua}) oder ein Glyzin (N_{ug}) an die Stelle des an Position 13 befindlichen Isoleuzins, so ist die Reassoziationsrate stark herabgesetzt.

Um die Interaktion oder Proximität der Proteine P1 und P2 zu messen, wird das N_{ub} an den N-Terminus des einen Proteins (P1) fusioniert, das C_{ub} mit dem anhängenden Reporterprotein (RE) an den C-Terminus des anderen Proteins (P2, s. Abb.1.2, A). Kommen sich die beiden Proteine P1 und P2 nun so nahe, dass die fusionierten Ubiquitinhälften reassoziieren können, wird das Reporterprotein abgespalten (Abb. 1.2, B). Anhand des veränderten Molekulargewichtes kann die Interaktion oder Proximität zwischen P1 und P2 erkannt

werden. Mit Hilfe der oben erwähnten N_{ub} -Mutanten (N_{ua} und N_{ug}) kann die Nähe zwischen P1 und P2 weiter abgestuft werden. Nur bei einer sehr starken lokalen Aufkonzentration von P1 und P2 kann die Mutante N_{ua} oder sogar N_{ug} mit dem C_{ub} effizient reassoziieren (Johnsson und Varshavsky, 1994 a).

Mit dem Split-Ub-System wird also die lokale Konzentration zweier Proteine gemessen. Die Begriffe Interaktion, Proximität oder Nähe werden hier im Sinne der lokalen Konzentration verwendet.

Der Vorteil des Split-Ub-Systems ist zum einen die Tatsache, dass in lebenden Zellen gearbeitet werden kann. Zum anderen muß die zu messende Reassoziationsreaktion nicht im Zellkern, wie beim herkömmlichen Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989), auftreten, sondern sie kann überall im Zytosol geschehen. Damit ermöglicht das Split-Ub-System auch die Untersuchung der Interaktionen von Membranproteinen (Wittke *et al.*, 1999). Dabei ist zu beachten, dass sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus der in Frage kommenden Proteine in das Zytosol ragen müssen.

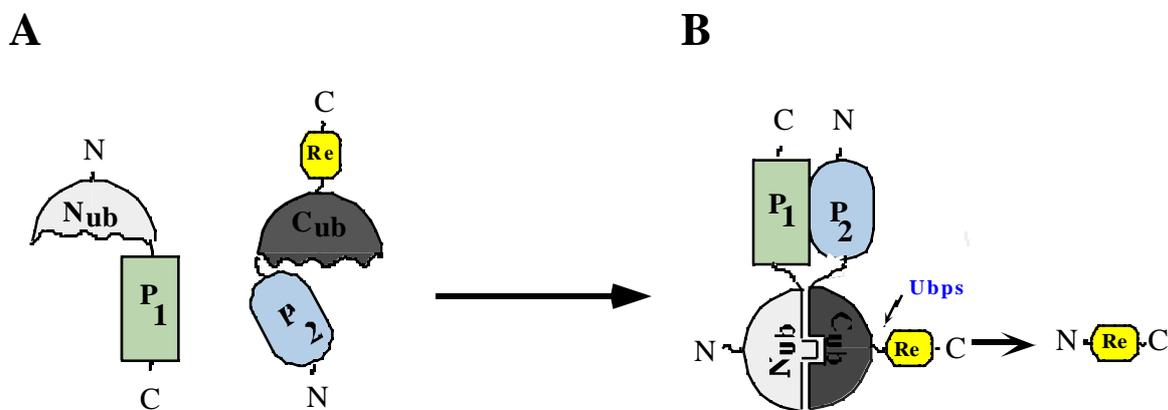


Abb. 1.2 Das Split-Ubiquitin-System. **A** An ein Protein (P1) ist am N-Terminus der N-terminale Teil des Ubiquitin (N_{ub}) fusioniert und am C-Terminus des anderen Proteins (P2) der C-terminale Teil des Ubiquitin (C_{ub}) mit nachfolgendem Reporterprotein (Re). **B** Werden nun beide Fusionsproteine in einer Zelle koexprimiert und interagieren die Proteine P1 und P2 miteinander, oder befinden sie sich auch nur in räumlicher Nähe voneinander, so kommen sich auch N_{ub} und C_{ub} nahe. Dies führt zu einer Reassoziationsreaktion der beiden Ubiquitinhälften zum vollständigen Ubiquitin. Dies wird von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Ubps) erkannt, die das Reporter-Protein abspalten.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob das Split-Ub-System zur Detektion der Interaktionen zwischen Bestandteilen der Translokationsmaschinerie und translozierenden Proteinen eingesetzt werden kann. Hierbei handelt es sich um eine transiente Interaktion, die bisher nicht in lebenden Zellen untersucht werden konnte. Es sollte vor allem die Funktion des Sec62p und seine molekularen Eigenschaften erforscht werden.

In einem zweiten Abschnitt sollte versucht werden, die Rolle des alternativen Sec-Komplexes bei der Translokation zu klären.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von Roth (Kandel), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und hatten in der Regel p.A. Qualität. Restriktionsendonukleasen sowie alle weiteren Enzyme für molekularbiologische Methoden wurden von New England Biolabs (NEB; Bad Schwallbach), Boehringer Mannheim (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Trans-Label [$-^{35}\text{S}$] wurde von Amersham-Buchler (Braunschweig) verwendet. Nährmedien für Bakterien- und Hefekultivierung waren von Difco (Augsburg).

2.2 Antikörper

Anti-HA (Hüllprotein des Influenza Virus) wurde von Babco (USA), anti-Flag wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase gekoppelte Ziege-anti-Maus und Ziege-anti-Kaninchen IgGs von BioRad (USA) verwendet.

Primäre Antikörper: anti-Sec62p aus Kaninchen	Donor: T. Rapoport
anti-Sec61p aus Kaninchen	Donor: T Rapoport
anti-Cpy1p aus Kaninchen	Donor: D. Wolf
anti-Dap1p aus Kaninchen	Donor: T. H. Stevens

2.3 Kulturmedien

Sämtliche Kulturmedien bzw. ihre Bestandteile wurden autoklaviert oder steril filtriert.

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

LB-Agar: LB-Medium mit 15 g/l Agar

YPD-Medium: 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2% (W/V) Glukose

YPD-Agar: YPD-Medium mit 20 g/l Agar

SD-Medium: 6,7 g/l Stickstoff-Base ohne Aminosäuren, 1% (W/V) 100 x AS-Lsg. (6 g/l L-Isoleucin, 2 g/l L-Arginin-HCl, 4 g/l L-Lysin-HCl, 1 g/l L-Methionin, 6 g/l L-Phenylalanin, 1 g/l L-Threonin), 0,2% Adenin-Lsg. (1% (W/V) in 0,1 M NaOH), 2% (W/V) Glukose.

Je nach Bedarf wurde mit 1% (V/V) 100 x L-Tryptophan-Lsg. (4 g/l), 1% (V/V) L-Leucin-Lsg. (6 g/l), 1% (V/V) 100 x L-Histidin-Monohydrat-Lsg. (2 g/l) und 0,4% Uracil-Lsg. (1% W/V in 0,1 M NaOH) komplementiert.

SD-Agar: SD-Medium mit 20 g/l Agar.

2.4 Antibiotika

Ampicillin wurde in einer Konzentration von 1 g/l eingesetzt. Geneticin (G 418) wurde in einer Konzentration von 200 µg/ml verwendet.

2.5 Bakterienstämme

Vom Stamm *Escherichia coli* K12 wurden die Subtypen XL1-blue (Stratagene, Heidelberg) und INV F' (Invitrogen, Niederlande) verwendet.

2.6 Hefestämme

Es wurden folgende Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit den angegebenen Genotypen verwendet:

JD 53	Mat <i>ura3-52 leu2,3-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63</i>	
RSY 529	<i>MATa his4 leu2-3,112 ura3-52 sec62-1</i>	R. Scheckman
DF5	Mat <i>trp1his3 lys2 leu2</i>	Thomas Sommer
YTX 87	Mat <i>his311,12 leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 can1-</i> 100	Thomas Sommer
YTX 112	Mat <i>trp1his3 lys2 leu2 ssh1::HIS3</i>	Thomas Sommer

YKF 16	<i>Matα his3^{11,12} leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 can1-</i> Thomas Sommer <i>100 Δsbh1::HIS3, Δsbh2::ADE2</i>
NJY73-I	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> S. Wittke <i>trp1Δ63 BOS1::CUP NUB-BOS1-303</i>
NJY61-I	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> S. Wittke <i>trp1Δ63 SEC61::CUP NUB-SEC61-304</i>
NJY61-A	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> S. Wittke <i>trp1Δ63 SEC61:: CUP NUA-SEC61-304</i>
NJY61-G	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> S. Wittke <i>trp1Δ63 SEC61:: CUP NUG-SEC61-304</i>
NJY129	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 SSH1::CUP NUB-SSH1-304</i>
NJY130	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 SSH1:: CUP NUA-SSH1-304</i>
NJY131	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 SSH1:: CUP NUG-SSH1-304</i>
NJY 132 I	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 SSH::CUP NUB-SSH1-303</i>
NJY 132	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 SEC61::CUP NUB-SEC61-303</i>
NJY133 I	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 BOS1::CUP NUB-BOS1-304</i>
NJY79RU	<i>MATα/MATα ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-</i> S. Wittke <i>3,112 his3Δ200/his3Δ200 lys2-801/lys2-801</i> <i>trp1Δ63/trp1Δ63 SEC63/SEC63-CUB-RURA-</i> <i>305</i>

NJY62-1	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 SEC62::CUP NUB-SEC62-306</i>
NJY74-I	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 BOS1::CUP NUB-BOS1-306</i>
NJY133 A	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 NUABOS1::pRS304</i>
NJY 133 G	<i>MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801</i> <i>trp1Δ63 NUGBOS1::pRS304</i>

2.7 Oligonukleotide

Der Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination von Plasmid-DNA ins Hefegenom erfolgte durch PCR mit den folgenden Oligonukleotiden:

Nub	5'-GATACCATCGACAACGTTAAGTCG-3'
Sec61-6	5'-CCCGTCGACCCGCCTTCTGGTGATTCATCATCTTC-3'
Ssh1-3	5'-CAGCCAGTGTATAGTAGCTTA-3'
Sec62-Y	5'-GAGCTATACAGGATAATGGATAATGGAAG-3'
kanRE	5'-GGATGTATGGGCTAAATG-3'
kanFW	5'-CCTCGACATCATCTGCC-3'
Sec72-3	5'-CTTTTATAAACAGATTT-3'
Sec72-4	5'-TTTATGAAGGTTTTTCT-3'

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Deletion des *SEC72*-Gens benutzt. Die Homologie zu den *SEC72*-UTR-Regionen ist fett gedruckt.

sec72-1	5'- ATTAGATTATATCTTTGAACATAAAACCAATAGCCTTACCAGCTG AAGCTTCGTACG -3'
sec72-2	5'- TTCACCGTTATATTCGGCCAGATTTCTTGCAGTTTCTATTAAAGG CCACTAGTGGATCTG -3'

2.8 Vektoren (Plasmide)

Zur Klonierung und für die Expression in Hefen wurden die Pendelvektoren pRS314-316 verwendet (Sikorski and Hieter, 1989). Außerdem wurde zur homologen Rekombination ins Hefegenom der Pendelvektor pRS303, pRS 304 und pRS306 eingesetzt (Sikorski and Hieter, 1989). Folgende Plasmide wurden dieser Arbeit zur Verfügung gestellt:

Plasmid:	NUB-314	erhalten von:	N. Johnsson
	NUB-SEC62-314		S. Wittke
	NUB-SEC62-316		N. Johnsson
	NUB-SEC61-304		S. Wittke
	NUA-SEC61-304		S. Wittke
	NUG-SEC61-304		S. Wittke
	NUB-SEC61-303		S. Wittke
	NUB-SSH1-304		S. Müller
	NUA-SSH1-304		S. Müller
	NUG-SSH1-304		S. Müller
	NUB-SSH1-303		S. Müller
	NUB-BOS1-304		S. Wittke
	NUA-BOS1-304		S. Wittke
	NUG-BOS1-304		S. Wittke
	NUB-BOS1-303		S. Wittke
	NUB-BOS1-306		N. Johnsson
	NUB-SEC62-306		N. Johnsson
	NUB-STE14-314		N. Lewke
	NUB-SED5-314		S. Müller
	NUB-GUK1-314		S. Müller
	NUB-TPI1-314		S. Müller
	NUB-SSS1-314		S. Müller
	NUB-SBH1-314		S. Müller

NUB-SBH2-314	S. Müller
CUB-DHA-316	N. Johnsson
MF 1-37CUB-DHA-314	N. Johnsson
MF 1-65CUB-DHA-314	N. Johnsson
SUC2-23CUB-DHA-314	N. Johnsson
SUC2-33CUB-DHA-314	N. Johnsson
SUC2-59CUB-DHA-314	N. Johnsson
SUC2-518CUB-DHA-314	N. Johnsson
TPI1CUB-DHA-314	S. Müller
MF 1-37CUB-URA3-314	N. Johnsson
MF 1-65CUB-URA3-314	N. Johnsson
SUC2-23CUB-URA3-314	N. Johnsson
SUC2-33CUB-URA3-314	N. Johnsson
SUC2-59CUB-URA3-314	N. Johnsson
Uta XII	N. Johnsson
SEC62DHA-314	S. Wittke
SEC62(C19)DHA-314	S. Wittke
SEC62(C35)DHA-314	S. Wittke
SEC62(C60)DHA-314	S. Wittke
SEC62(C125)DHA-314	S. Wittke
SEC62(N107)DHA-314	S. Wittke

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Eine 10 ml Hefekultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 2 - 3 angezogen. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 10 min bei 3500 rpm (Haereus Varifuge 3.2 RS) geerntet und in

H₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und auf 300 µl Glasperlen (425-600 µm, säuregewaschen) pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol wurden die Zellen durch dreiminütiges Vortexen aufgeschlossen, mit 200 µl TE-Puffer versetzt und bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Haereus) für 5 min zentrifugiert. Die gen. DNA enthaltende wäßrige (obere) Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde die wäßrige Phase abgenommen, 1 ml Ethanol zugegeben und 2 min zentrifugiert (s.o.). Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Die im Präzipitat enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 8 µl RNase (1 mg/ml) und einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C abgedaut. Nach wiederholter Ethanolfällung wurde die genomische DNA in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Lysispuffer: 2% (V/V) Triton X-100; 1% (V/V) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA

2.1.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* ("Minipräp")

Von einer LB-Agarplatte mit Ampicillin (2 g/l) wurde eine Einzelkolonie in das entsprechende Medium überführt und üN bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm (Haereus-Tischzentrifuge) für 5 min bei RT geerntet. Das Bakterienpellet wurde in STETL-Puffer und 7,5 µl Lysozym (10 mg/l) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die Probe 40 sec gekocht und anschließend 20 min bei 13000 rpm (Haereus-Tischzentrifuge) und RT zentrifugiert. Die Pellets aus den entstandenen Zelltrümmern wurden mit einem Zahnstocher entfernt. Die Plamid-DNA wurde nach Zugabe von 150 µl Isopropanol aus dem Überstand durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Haereus-Tischzentrifuge) für 20 min bei RT gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem (V/V) Ethanol gewaschen, wie vorher 5 min zentrifugiert, getrocknet und schließlich in 50 µl TE gelöst.

STETL-Puffer: 8% (W/V) Saccharose, 5% (V/V) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA

2.1.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.1.3.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Enzyme mit Hexamererkennungssequenzen verwendet. Für einen analytischen Verdau wurde 1 µg DNA mit 1 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1-2 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Reaktion wurde der jeweilige Puffer des Herstellers verwendet. Bei einem präparativen Verdau wurden 5 µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und bei Bedarf entsprechend 2.9.9 aus dem Gel eluiert.

2.1.3.2 Ligation

Die kovalente Verknüpfung (Ligation) zweier DNA-Moleküle (Plasmid und einzufügendes DNA-Fragment) mit kohäsiven Enden erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Dabei wurden jeweils 20-50 ng Vektor-DNA eingesetzt. Das einzufügende DNA-Fragment wurde in doppelter molarer Menge hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt, auf 10 µl mit H₂O aufgefüllt und üN bei RT inkubiert.

PCR-Produkte wurden ohne vorherigen Restriktionsverdau in den pCR2.1 Vektor ligiert. Hierfür wurden die PCR-Produkte vorher 20 min mit Taq DNA-Polymerase bei 72°C inkubiert. Diese DNA-Polymerase fügt am 3'-Ende ein einzelnes Adenosinnukleotid hinzu, das die Ligation in den pCR2.1 Vektor ermöglicht, der über ein 5'- überstehendes Thymidinnukleotid verfügt. Die Ligation erfolgte hier gemäß Herstellerangaben.

2.1.4 Kompetente Zellen und Transformation in *E. coli*

Chemisch-kompetente *E. coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit einer 3 ml üN-Kultur angeimpft. In diesem Volumen wurden die Zellen bis zu einer deutlichen Eintrübung bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde dann auf 500 ml

LB-Medium aufgefüllt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Nach Abkühlen auf Eis für 30 min wurden die Zellen durch eine zehnmünütige Zentrifugation (3500 rpm, 4°C, JA14 Rotor) geerntet. Das Zellpellet wurde in eiskaltem Tfb1-Puffer auf Eis resuspendiert und erneut abzentrifugiert (s.o.), in 20 ml eiskaltem Tfb2-Puffer aufgenommen und in Portionen von 100 µl aliquotiert. Je nach Bedarf wurden die Zellen direkt transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden je 100 µl der kompetenten Zellen mit 4 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann für 5 min einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt, anschließend mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf LB-Amp-Platten ausplattiert.

Tfb1-Puffer: 30 mM KOAc; 50 mM $MnCl_2$; 100 mM KCl; 10 mM $CaCl_2$; 15% (V/V)
Glycerol

Tfb2-Puffer: 12,5 mM Na-MOPS, pH 7; 12,5 mM KCl; 95 mM $CaCl_2$; 18,75% (V/V)
Glycerol

Elektro-kompetente *E.coli*

Eine höhere Transformationsrate als die chemisch kompetent *E. coli* ergeben Bakterien, die zur Elektro-Transformation geeignet sind.

1 l LB-Medium wurde mit einer 3 ml üN-Kultur angeimpft. Bei einer OD_{600nm} von 0,4 ließ man die Zellen für 30 min auf Eis abkühlen. Durch eine zehnmünütige Zentrifugation (3500 rpm, 4°C, JA14 Rotor) wurden die Zellen geerntet. Das Zellpellet wurde zwei Mal in sterilem, destilliertem Wasser und zwei Mal in 10%igen Glycerol gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 25 ml 10%igem Glycerol aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in 40 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Zur Elektro-Transformation ließ man die Zellen schonend auf Eis auftauen. Nach Zugabe von 0,5 µl eines Ligationsansatzes wurden die Zellen in Elektro-Küvetten (Biorad,), die ebenfalls auf Eis standen, umgefüllt. Die eigentliche Transformation erfolgte mit Hilfe eines

Elektroporators (Biorad,CVCV). Bei der Geräteeinstellung 2,5 KV, 250 m und 25 μ F wurde ein elektrisches Feld in der Küvettem aufgebaut. Nach der Elektro-Poration wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf LB-Amp-Platten aufgetragen.

2.1.5 Kompetente Zellen und Transformation in *S. cerevisiae*

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde die Lithium-Acetat-Methode nach Gietz *et al.* (1992) angewendet. 300 ml YPD- bzw. entsprechendes SD-Medium wurden mit einer 30 ml üN-Kultur des entsprechenden Stammes so angeimpft, daß sich eine OD_{600nm} von 0,2 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (4500 rpm, 8 min, RT, JA14 Rotor) geerntet. Nach einem Waschschrift in H₂O wurde das Zellpellet in 1,5 ml eiskalter LiAc-TE-Lsg. auf Eis resuspendiert und in 100 μ l Aliquots aufgeteilt. Die Zellen konnten sofort zur Transformation verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Für eine Hefetransformation wurde zunächst gescherte Lachssperma-DNA (10 mg/ml) durch zehnminütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. 10 μ l dieser DNA-Lösung wurde dann zu einem Aliquot kompetenter Hefezellen gegeben. Anschließend wurden 1 μ g Plasmid-DNA und 600 μ l LiAc-TE-PEG-Lsg. hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde dann 30 min bei RT geschüttelt. Danach erfolgte ein zehnminütiger Hitzeschock bei 42°C. Bei temperatursensitiven Hefestämmen wurde die Temperatur des Hitzeschocks auf 37°C reduziert. Zuletzt wurden die Zellen ca. 10 sec bei 10000 rpm (Tischzentrifuge) pelletiert, in 100 μ l 1 x TE aufgenommen und auf entsprechenden selektiven SD-Platten ausplattiert.

10 x TE: 100 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA

10 x LiAc: 1 M Li-Acetat, pH 8

LiAc-TE-Lsg.: 1 ml 10 x LiAc, 1 ml 10 x TE, 8 ml H₂O

LiAc-TE-PEG-Lsg.: 1 ml 10 x LiAc, 1 ml 10 x TE, 50% (W/V) PEG (durchschnittliches MW 3350 Da)

2.1.6 Homologe Rekombination

Um Plasmide homolog in das Hefegenom zu integrieren, wurde eine integrative Transformation nach Hinnen *et al.* (1978) durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmid an einer einmaligen Schnittstelle im Hefegenom durch eine Restriktionsendonuklease linearisiert. Zur Kontrolle der vollständigen Restriktion wurden 3 µl des Restriktionsansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der verbleibende Ansatz wurde für eine Hefetransformation (2.9.5) eingesetzt. Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels PCR überprüft. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.7 aufgeführt.

2.1.7 Plasmid-Austausch

Durch Plasmid-Austausch-Experimente wurden Hefestämme erstellt, die eine bestimmte Version des Sec62p als einzige Version dieses Proteins exprimieren. Zellen des Stammes 62-F62 wurden mit Plasmiden, von denen die jeweiligen Sec62p-Versionen exprimiert werden, transformiert und anschließend in Flüssig-Medium mit Uracil über Nacht inkubiert. Dadurch haben Zellen, die eine funktionelle Versionen des Sec62p tragen, die Möglichkeit das Plasmid mit FLAG-SEC62 zu verlieren. Ein Aliquot der Zellen wurde danach auf FOA-Platten ausplattiert, um auf Zellen zu selektionieren, die keine Ura3p-Aktivität besitzen. Kolonien von diesen Platten wurden weiter auf FOA-Platten umgestrichen. Der Verlust des Plasmides, das FLAG-Sec62p exprimiert wurde mittels PCR und Western-Blot-Analyse mit Hilfe des Anti-FLAG-Antikörpers überprüft.

Oligonukleotide für den Test des Plasmid-Austausches:

Name	Oligonukleotid 5'-3'
Sec62Y	GAGCTATACAGGATAATGGATAATGGAAG
Flag	

2.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine analytische PCR wurde ca. 1 pg Plasmid-DNA als Matrix verwendet. Der PCR-Ansatz bestand zusätzlich aus 0,2 mM Desoxynukleotiden (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot), 0,4 µM Primern (sense und antisense), 10 µl 10 x Taq-Polymerase-Puffer des Herstellers und 1 µl Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl). Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl in einem Tri-Block PCR Heizblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Folgendes Temperaturprogramm wurde zyklisch durchlaufen: 95°C, 30 sec (Aufschmelzen der DNA); 58°C, 30 sec (Bindung der Primer); 72°C, 1 min (Synthese des komplementären Stranges).

Alternativ wurde eine PCR auf mit Plasmid-DNA transformierten Hefen durchgeführt. Hierzu wurde eine Hefekolonie in den PCR-Ansatz (s.o.) gegeben und die Taq-DNA-Polymerase erst nach einer 15 min Inkubation des Ansatzes bei 98°C (Aufbrechen der Hefezellen) hinzugegeben. Die Analyse des amplifizierten DNA-Abschnitts erfolgte elektrophoretisch.

Für eine präparative PCR wurde genomische Hefe-DNA als Matrix und PWO (mit Korrekturaktivität) als DNA-Polymerase (5 U/µl) mit dem entsprechendem 10 x PCR-Puffer des Herstellers eingesetzt.

2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Elektrophoresen wurde die DNA in Gelen mit 1 - 2% (W/V) Agarose in 1 x TAE aufgetrennt. Die horizontalen Agarosegele wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben angefertigt. Vor dem Auftragen wurde die DNA-Probe mit 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer versetzt und in die Probenflasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE bei 80-150 V. Als Größenstandard wurde 1 kB-DNA-Leiter von Gibco-BRL (Eggenstein) verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und durch Photographie dokumentiert.

50 x TAE: 242 g Tris, pH 8; 57,1 ml Tris-Acetat; 37,2 g EDTA auf 1 l

6 x Probenpuffer: 0,6 M Tris-HCl, pH 8; 50 mM EDTA; 60% (V/V) Glycerol; 0,25% (W/V) Bromphenolblau

2.1.10 Elution von DNA aus Agarosegelen

Nachdem die DNA-Fragmente präparativ im Agarosegel aufgetrennt worden waren, wurden sie unter UV Licht ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mittels DNA-Extraktionskit (Machery-Nagel, Schweiz) laut Herstellerangaben. Die DNA wurde hierbei aus der Gelmatrix gelöst und anschließend an eine Silicagelmembran gebunden, gewaschen und mit H₂O eluiert.

2.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht dabei 20 µg/ml Oligonukleotid oder 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Da die aromatische Restgruppe in Proteinen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, konnte durch den Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} die Reinheit einer DNA-Lsg. abgeschätzt werden.

2.1.12 Extraktion von DNA

Zur Abtrennung von Proteinen wurde die DNA-Lösung zuerst mit einem Volumen Phenol und anschließend mit einem Volumen Chloroform (Chloroform/Amylalkohol=24:1) extrahiert. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge). Die DNA enthaltende wäßrige Phase wurde nach der Extraktion gefällt (2.9.12).

2.1.13 Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurden der Lösung 0,1 Volumen 5 M Ammoniumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm 20 min (Tischzentrifuge) abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde vakuumgetrocknet, in H₂O oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.1.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von DNA wurde von der ADIS-Sequenzierungsgruppe des MPI, Köln durchgeführt. Hierfür wurden die DNA-Lösungen, die mittels Minipräp (2.9.2) hergestellt wurden, durch DNA-Extraktion und -Fällung vorbereitet.

2.1.15 Konstruktion der verwendeten Vektoren

Alle verwendeten Hefegene wurden mittels präparativer PCR aus dem Hefegenom (*S. cerevisiae*, *S. pombe* und *Y. lipolytica*) oder von Plasmid-DNA mit humanem SEC62 amplifiziert (2.9.7). Es folgte eine Subklonierung der Amplifikate in pCR2.1 (Invitrogen, Niederlande). Diese Plasmide wurde auf die Richtigkeit der PCR-amplifizierten DNA-Abschnitte durch DNA-Sequenzierung überprüft. Dann wurden die Gen-Inserte in entsprechende Vektoren kloniert. Die Quellen der Ausgangsvektoren, die für die Klonierungen eingesetzt wurden, sind 2.8 zu entnehmen. Sofern nicht anders angegeben wurde bei allen Konstrukten der *CUPI*-Promotor verwendet. Eine schematische Darstellung der exprimierten Proteine befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Im Folgenden sind die verwendeten Oligonukleotide, die benutzten Restriktionsendonukleasen und das klonierte Plasmid angegeben.

Konstrukt	Oligonukleotid 5'-3'	Schnittstellen
NUB-SEC62-DHA-314	GGATCCCTGGGTCTGGGGTAGCCG	BamHI
NUB-SEC62(C19)-DHA-314	AGCAAACA	
NUB-SEC62(C35)-DHA-314		
NUB-SEC62(C60)-DHA-314		
NUB-SEC62(C125)-DHA-		

314		
NUB-SEC62-DHA-314 SEC62(N206)-CUB-DHA-314 SEC62(N218)-CUB-DHA-314 NUB-SEC62(N206)-DHA-314 NUB-SEC62(N218)-DHA-314	GTCGACCCGCCGTTTTGTTTCGGCT TTTTTCATTGATGGC	SalI
NUB-SEC62(C19)-DHA-314	TCAGGTCGACCCTTTCTTCTTCATT CTTTT	SalI
NUB-SEC62(C35)-DHA-314	GTCGACTCACAAAAACCGTAAAG	SalI
NUB-SEC62(C60)-DHA-314		SalI
NUB-SEC62(C125)-DHA-314	GGGCCCTCAGGTCGACCCATCCAT GTAGGTTCTAGGGTT	SalI
NUB-SEC62(N107)-DHA-314	CCCCGGATCCCTGGGTCTGGGGTG ATCCCAGTGAAAAAATTG	BamHI
SEC62(N206)-CUB-DHA-314	CCGCCCGAATTCATGAGATTGATA TTATATGTTTTG	EcoRI
SEC62(N218)-CUB-DHA-314	CCGCCCGAATCCATGAAAGATGTT GGTGGGTCTGG	EcoRI
NUB-SEC62(N206)-DHA-314	CGCGGGATTCCCGGGAGCGGCAG ATTGATATTATATGTTTTG	BamHI
NUB-SEC62(N218)-DHA-314	CGCGGGATTCCCGGGAGCGGCAA AGATGTTGGTGGGTCTGG	BamHI

NUB-SEC62S.p.-314	TCGGGATCCCTGGGTCTGGGATGG ATTCTTCTAATGTAC	BamHI
NUB-SEC62S.p.-314	CCGTCCGTCGACCCGCCTTCAGAG ACTTCTTCTTCGACGG	SalI
NUB-SEC62Y.l.-314	GGATTCCTGGGTCTGGGATGACTG AGAACGTGCCTCAAG	BamHI
NUB-SEC62Y.L.-314	GTCGACCCTACATCTATTACTAAA TCTC	SalI
NUB-SEC62H.s.-314	AGATCTCTGGGTCTGGGATGGCGG AACGCAGGAGACACAAG	BglII
NUB-SEC62H.s.-314	GTCGACCCTCTTGTACTTATTCATT CAGTCCC	SalI
NUB-SEC62(N107)-DHA-314	CGCGGGATTCCCGGGAGCGGCGT GATCCCAGTGAAAAAATTG	BamHI
DAP1-68UB-DHA-314 DAP1-80UB-DHA-314 DAP1-100UB-DHA-314	CCTCCATCGATATGGAAGGTGGCG AAGAAG	ClaI
DAP1-68UB-DHA-314	CCTCCGTCGACCCCCATCATTGG TGTAATTAG	SalI
DAP1-80UB-DHA-314	CCTCCGTCGACCCATTGTTTCTTA CAACAGAAA	SalI
DAP1-100UB-DHA-314	CCTCCGTCGACCCGCTTTCAATTT TATTGTCAC	SalI
KAR2-32UB-DHA-314	CCTCCATCGATATGTTTTTCAACA GACTAA	ClaI
KAR2-32UB-DHA-314	CCTCCGTCGACCCAACAGTTCCGT AGTTTTCTA	SalI

Tab. 2.1 Angegeben sind die Oligonukleotide und Restriktionsschnittstellen für die in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte.

2.1.1.1 Erstellen der Punktmutanten

Zum Erstellen von gerichteten Punktmutanten wurde eine PCR durchgeführt. Hierbei wurde die gewünschte Punktmutation durch Synthese zweier Oligonukleotide (sense und antisense) eingefügt. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, daß sie den zu mutierenden DNA-Bereich umfaßten und sich etwa 30 Nukleotide weit überlappten. Die ersten PCR-Reaktionen wurden mit je einem mutierten Oligonukleotid und je einem Oligonukleotid, das entweder am Genanfang oder Genende band, durchgeführt. Als Matrix diente Plasmid-DNA, die die geeigneten SEC62-Versionen verschiedener Spezies enthielt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden über Säulen (Boehringer, Mannheim) gereinigt, um sie von freien Oligonukleotiden zu trennen. Die zweite PCR diente zur Amplifikation des gesamten Gens. Hier wurden die beiden gereinigten PCR-Fragmente als Matrizen eingesetzt. Als Oligonukleotide wurden wieder die an Genanfang und -ende bindenden verwendet. Das amplifizierte Fragment sollte jetzt die entsprechende Punktmutation aufweisen und konnte zum Klonieren eingesetzt werden. Die Mutation wurde durch Sequenzanalysen verifiziert. Alle PCR-Reaktionen wurden mit PWO-Polymerase (Boehringer, Mannheim) durchgeführt.

Konstrukt	Oligonukleotid 5'-3'	Restriktionsschnittstelle
SEC62(R207K)-314	GGATCCCTGGGTCTGGGGTA	
SEC62(R207Q)-314	GCCGAGCAAACA	
SEC62-I-314		
SEC62-II-314		
SEC62-III-314		
SEC62-IV-314		
SEC62-V-314		
SEC62-VI-314		
SEC62-VII-314		
Und alle NUB-Versionen dieser Mutanten		
SEC62(R207K)-314	62-K-1 TAATGACAAAACATATAATA	

	TCAATTTTCAGGATAGCGAC	
SEC62(R207K)-314	62-K-2 GGCTTCTTTGCTGTCGCTATC CTGAAATTGTATTTATATG	
SEC62(R207Q)-314	62-Q-1 TAATGACAAAACATATAATA TCAATTGCAGGATAGCGAC	
SEC62(R207Q)-314	62-Q-2 GGCTTCTTTGCTGTCGCTATC CTGCAATTGATATTATATG	
SEC62-I-314	Sec62-I-1 CAAAGATGTTGGGTTCTGGA TCGCTCCCAACCTGTTC	
SEC62-I-314	Sec62-I-2 CACCGCAATCTTCGAACAGG TTGGGAGCGATCCAGAACCC	
SEC62-II-314	Sec62-II-1 AGATGTTGGGTTCTGGATCTT TGCCAACCTGTTCGAA	
SEC62-II-314	Sec62-II-2 GTACACCGCAATCTTCGAAC AGGTTGGCAAAGATCCAGAA	
SEC62-III-314	Sec62-III-1 TGTTGGTGGCTGGATCTTTCC CGCCCTGTTCGAAGAT	
SEC62-III-314	Sec62-III-2 CTAGTACACCGCAATCTTCG AACAGGGCGGGAAAGATCC A	
SEC62-IV-314	Sec62-IV-1	

	TGGTGGGTTCTGGATCTTTCC CAACGCGTTCGAAGATTGC	
SEC62-IV-314	Sec62-IV-2 TCTCTAGTACACCGCAATCTT CGAACGCGTTGGGAAAGAT	
SEC62-V-314	Sec62-V-1 CTGGATCTTTCCCAACCTGTT CGAAGCTTGCGGTGTACTA	
SEC62-V-314	Sec62-V-2 GCTTAAACTCTCTAGTACA CCGCAAGCTTCGAACAGGTT	
SEC62-VI-314	Sec62-VI-1 CAAAGATGTTGTTGGGTTCT GGATCGCTCCCGCCCTGTTC GAAGAT	
SEC62-VI-314	Sec62-VI-2 CTAGATCAACGCAATCTTCG AACAGGGCGGGAGCGATCCA GAACCC	
SEC62-VII-314	Sec62-VII-1 CAAAGATGTTGGTGGGTTCT GGATCGCTCCCGCCGCGTTC GAAGCTTGCGGTGTACTA	
SEC62-VII-314	Sec62-VII-2 GCTTAAACTCTCTAGTACA CCGCAAGCTTCGAACGCGGC GGGAGCGATCCAGAACCC	

Tab. 2.2 Angegeben sind die verwendeten Oligonukleotide und Restriktionsschnittstellen für die in dieser Arbeit erstellten Punktmutanten.

2.1.1.2 Klonierung der NUB-SEC62-Konstrukte

Als Vektoren wurde *NUB-SEC62-314* verwendet, der mit *BamHI* und *Sall* restriktionsverdaut wurden. Die pCR2.1-Vektoren mit den entsprechenden PCR-Produkten wurden mit den selben Restriktionsendonukleasen behandelt. Eine Ausnahme bildet dabei NUB-SEC62H.s.. Hier wurde das PCR-Produkt in pCR2.1 mit *BglIII* und *Sall* geschnitten.

2.1.1.3 Klonierung der NUB-SEC62-DHA-314-Deletionsmutanten

Als Vektor diente NUB-SEC62-DHA-314, der mit *BamHI* und *Sall* geschnitten wurde. Alle Deletionsmutanten des *SEC62* in den pCR2.1 Vektoren wurden mit den selben Enzymen behandelt.

2.1.1.4 Klonierung der C_{ub}-Translokationssubstrate

Um die C_{ub}-Translokationssubstrate auf pRS-Vektoren mit dem passenden metabolischen Marker zu haben, wurden diese über die Restriktionsschnittstellen *SacII* und *ApaI* in die entsprechenden Leervektoren kloniert.

2.1.1.5 Klonierung der Ub-Translokationssubstrate

Die Vektoren mit den Ub-Translokationssubstraten wurden aus den entsprechenden Vektoren mit den C_{ub}-Translokationssubstraten erstellt. Über die Schnittstellen *EagI* und *BglIII* wurden die entsprechenden Abschnitte in den Vektor UtaXII kloniert (Johnsson und Varshavsky, 1994 b)).

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Gesamtproteinextraktion aus *S. cerevisiae*

10 ml einer Hefekultur wurden im entsprechenden Medium bis zu einer OD_{600nm} von 1 wachsen gelassen. Die Hefezellen wurden durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 3500 rpm (Haereus Varifuge 3.2 RS) geerntet und in 150 μ l Lysispuffer, versetzt mit je 1/40 Volumen 2 M NEM und 4,1 mM PMSF, aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 150 μ l Glasperlen (425-600 μ m, säuregewaschen) pipettiert und die Zellen durch sechsfaches Vortexen und Kühlen auf Eis für je 30 sec aufgeschlossen. Zelltrümmer und Glasperlen wurden 10 min bei 13000 rpm und 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417 R) abzentrifugiert und der Proteinüberstand abgenommen. 50 μ l des Überstands wurden mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt; parallel dazu wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt.

Lysispuffer: 50 mM Hepes, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 1% (V/V)
 Triton X-100

2 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% (V/V) β -Mercaptoethanol; 4% (W/V)
 SDS; 20% (V/V) Glycerol; 0,01% (W/V) Bromphenolblau

2.10.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Um die Gesamtproteinkonzentration nach der Extraktion (2.10.1) zu bestimmen, wurde der Farbstoffbindungstest nach Bradford (1976) durchgeführt. Für jede Extraktion wurden zwei Werte bestimmt, indem jeweils 5 μ l des Proteinüberstandes abgenommen wurden. Diese wurden mit 200 μ l H₂O und 800 μ l Bradfordreagenz (Amresco, USA) versetzt. Nach 15 - 30 minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in Referenz zum Leerwert gemessen. Hieraus errechnete sich die relative Proteinmenge, die auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurde, um die gleiche Proteinmengen der einzelnen Extrakte zu erhalten.

2.10.2 SDS-PAGE

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Für die Gelelektrophorese wurde das Gelsystem von Hoefer (USA) verwendet, die Abmessungen der Gele betragen 18 cm x 16 cm x 0,75 mm. Die Proben wurden zur vollständigen Denaturierung gekocht und zusammen mit einem Proteingrößenstandard (Low Molecular Weight, Amersham Pharmacia, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für das Sammelgel und 220 V für das Trenngel.

Sammelgel: 5,8 ml H₂O; 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 80 µl 10% (W/V) SDS; 1,2 ml 30% (W/V) Acrylamidlösung; 80 µl 10% (W/V) APS; 20 µl TEMED

Trenngel: 12%: 5 ml H₂O; 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 150 µl 10% (W/V) SDS; 6 ml 30% (W/V) Acrylamidlösung; 150 µl APS; 40 µl TEMED

10%: 6 ml H₂O; 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 150 µl 10% (W/V) SDS; 5 ml 30% (W/V) Acrylamidlösung; 150 µl APS; 40 µl TEMED

2.10.3 Pulse-Experiment

Hefezellen wurden in 10 ml SD-Medium bis zu einer OD_{600nm} von ca. 1 herangezogen und die Proteinexpression ggf. mit Cu²⁺ (1 mM) induziert. Nach dem Ernten (3500 rpm, 10 min, Haereus Varifuge 3.2 RS) wurden die Zellen in 1 ml SD-Met-Medium, das gegebenenfalls 1 mM Cu²⁺ enthielt gewaschen und in 500 µl desselben Mediums aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 30 min. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 10 µl ³⁵S-Translabel 5 min oder 10 min markiert. Die Suspension wurden kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge 13000 rpm) und der radioaktive Überstand abgenommen. Es folgte eine Resuspension der Zellen in 200 µl Lysispuffer 1 und dreiminütiges Kochen. Dann wurden 1,8 ml Lysispuffer 2 hinzupipettiert und 10 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde abgenommen und die Einbaurate von ³⁵S-Met bestimmt. Für die Präzipitation der HA-tragenden Proteine wurden 5 µl Anti-HA-Antikörper der an Agarose-Kugeln gekoppelt vorliegt, zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Um Agarose-Kugeln-gekoppelten Antikörper zu sparen und das Volumen an abzentrifugierbarem Material zu erhöhen, wurden noch 20 µl Sepharose-Kugeln zugegeben.

Bei Verwendung des Anti-CPY-Antikörpers oder des Anti-Dap2p-Antikörpers wurden je 5ml verwendet und bei 4°C über Nacht unter Drehen inkubiert. Anschließend wurde dann an Agarose-Kugeln gebundenes Protein A hinzugegeben um die an die Proteine gekoppelten Antikörper zu präzipitieren. Hier erfolgte wiederum eine Inkubation bei 4°C über Nacht unter Drehen.

Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen in 800 µl Lysispuffer 2 (ohne NEM, PMSF und Protease-Inhibitoren und mit 0,1 % (W/V) SDS) und einmaliges Waschen in 800 µl 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 entfernt. Die präzipitierten Proteine wurden in 25 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt.

Lysispuffer 1: 1% (W/V) SDS; 15 mM DTT; 45 mM Hepes, pH 7,5

Lysispuffer 2: 50 mM Hepes, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 1% (V/V) Triton X-100; 500 µM PMSF; 50 mM NEM; 1 µg/ml Pepstatin; 2,5 µg/ml Aprotinin; 5 µg/ml Leupeptin; 5 µg/ml Antipain

2.10.3.1 Bestimmung der Einbaurate

Nach der Zellyse (2.10.3) wurden 20 µl des Proteinüberstandes abgenommen, um die Einbaurate von ³⁵S-Met zu bestimmen. Die Proteinlösung wurde auf Filterpapier getropft, kurz getrocknet und zweimal in kalter 10%iger (W/V) TCA präzipitiert. Um markierte t-RNA zu entfernen, wurden die Filter anschließend 2 min in 10%iger (W/V) TCA gekocht. Dann wurden die Filter in Ethanol gewaschen, bei 65°C getrocknet und der ³⁵S-Gehalt im Scintillator bestimmt. Für die Proteinpräzipitation wurde die Menge an radioaktiv markiertem Protein standardisiert.

2.10.3.2 Phospho-Imaging

Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine wurden die Proteine zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden im SDS-Gel durch eine einstündige Inkubation in 15% (V/V) Methanol und 10% Essigsäure (V/V) präzipitiert. Das Gel wurde anschließend auf Whatmanpapier gelegt und bei 80°C für eine Stunde vakuumgetrocknet. Es folgte eine Exposition in einer Phosphoimager-Kassette für einige Tage. Die Auswertung erfolgte am Phosphoimager (Amersham, Braunschweig) durch die dazugehörigen Software-Programme.

2.10.4 Differentielle Zentrifugation

Hefezellen (50 OD 600nm) wurden in sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 0,5 ml Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und im selben Volumen an Glasperlen durch Vortexen aufgeschlossen (im Wechsel 30 sec Vortexen und 30 sec auf Eis, insgesamt 15 Mal). Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 500 g. Das Pellet (P1) wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 min gekocht. Der Überstand wurde für die weiteren Zentrifugationen eingesetzt. Zunächst wurde bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet (P2) wurde wieder in SDS-Probenpuffer aufgenommen und gekocht. Der Überstand wurde für den letzten Zentrifugationsschritt bei 100000 g für 1 h verwendet. Überstand (S) und Pellet (P3) wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und gekocht. Der Überstand wurde zuvor gefällt um ein geeignetes Volumen zu erreichen. Die Proben wurden im Western-Blot analysiert.

Lysispuffer: 0,8 M Sorbitol; 1mM EDTA; 10 mM MOPS pH 7,0; Protease-Inhibitoren:
1 µg/µl Aprotinin, 1 µg/µl Leupeptin, 1 µg/µl Pepstatin und 0,5mM PMSF

Für die Extraktion der Proteine aus der Membranfraktion der Zentrifugation wurde der Lysispuffer mit folgenden Reagenzien versetzt: 2% SDS; 1% Triton X-100; 0,5 M NaCl; 1,6 M Harnstoff. Nachdem die Pellet-Fraktion in den verschiedenen Lösungen gelöst worden ist, erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 10000g. Pellet und Überstand wurden gefällt und im Western-Blot analysiert.

2.10.5 Fällung von Proteinen

Bei zu geringer Proteinkonzentration wurden die Proteine für die SDS-PAGE gefällt. Dazu wurde eine Proteinlösung mit 50%iger (W/V) TCA auf 7% (V/V) eingestellt und bis zu einer Stunde bei RT inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) für 20 min abzentrifugiert, mit 70%igem (V/V) Ethanol gewaschen und

lyophilisiert. Das Proteinpellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE verwendet.

2.10.6 Western-Blot-Analyse

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen, erfolgte durch halbtrockenes (semi-dry) Elektrotansferverfahren (Transfer nach Kyhse-Andersen, 1984). Hierzu wurde das Gel auf die Membran gelegt, die zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurde. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese vor der Äquilibrierung in Methanol getränkt. Der Transfer erfolgte zwischen je drei Lagen Whatman-Papier in einem Semiphor-Blotapparat (Hoefer, Freiburg) bei konstanter Stromstärke von 250 mA für 30-60 min. Anschließend konnten die transferierten Proteine mit Ponceau S-Lsg. reversibel angefärbt werden. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Waschen mit H₂O. Um nach dem Transfer noch freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde in HBST mit 5% (W/V) Magermilchpulver leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 1 h mit dem ersten Antikörper inkubiert, der in HBST mit 5% (W/V) Magermilchpulver verdünnt wurde. Es erfolgte dann ein mehrmaliges Waschen in HBST für eine Stunde. Es schloß sich eine Inkubation für 1 h mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten und an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper an, der ebenfalls in HBST mit 5% (W/V) Magermilchpulver verdünnt wurde. Die Membran wurde erneut 1 h mehrmals mit HBST gewaschen. Der Nachweis der Peroxidase des 2. Antikörpers wurde mit dem ECL-Kit (Pierce, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Detektion der Lichtemission erfolgte entweder durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak, USA) oder mittels Lumi-Imager (Boehringer, Mannheim).

Nach dem Ablösen des ersten und zweiten Antikörpers (Strippen) konnte die Membran erneut genutzt werden. Die Membran wurde dazu 30 min bei 50°C unter Schütteln in 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM β -Mercaptoethanol und 2% (W/V) SDS inkubiert und anschließend 2 x 15 min mit HBST gewaschen.

Transferpuffer (1l): 2,9 g Tris-Base, 14,3 g Glyzin, 200 ml Methanol; 5 ml 10% (W/V) SDS
Ponceau S-Lsg.: 0,25% (W/V) Ponceau S, 15% (V/V) Eisessig, 40% (V/V) Methanol

HBST: 150 mM NaCl; 20 mM Hepes, pH 7,5; 0,2% (V/V) Tween 20

2.10.7 Ko-Immunopräzipitation zytosolischer Proteine

Eine 300 ml-Kultur von Hefezellen wurde bei einer OD_{600nm} geerntet und mit sterilem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml DB-Puffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und mit 3 ml Glasperlen versetzt. Durch Vortexen wurden die Zellen aufgeschlossen (30 sec Vortexen und 30 sec Inkubation auf Eis im Wechsel, insgesamt 15 Mal). Durch eine Zentrifugation bei 550 g wurden die Zelltrümmer sowie Zellkerne und Mitochondrien entfernt. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde bei 10000 g zentrifugiert (10 min bei 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde schließlich für die Ko-Immunopräzipitation eingesetzt. Dazu wurde mit dem an Agarose gekoppelten Anti-HA-Antikörper präzipitiert (15 µl), das Präzipitat gewaschen und in SDS-Pobepuffer aufgenommen (s. 2.10.3). Nach dreiminütigem Kochen wurden die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot erstellt. Bei diesem wurde der Anti-FLAG-Antikörper zur Immunodetektion verwendet. Das Experiment wurde auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit 5 µl Anti-FLAG-Antikörper versetzt. Danach wurde Agarose-gekoppeltes Protein A zugegeben, um die an den Antikörper gekoppelten Proteine zu präzipitieren. Der anschließende Western-Blot erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

DB-Puffer: 50mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM Na-HEPES, pH 7,5; Protease-Inhibitoren: 1mM PMSF, 10mM DTT, 10 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Chymostatin

3 Ergebnisse

Das Protein Sec62p ist eine Komponente des tetrameren Sec-Komplexes, der an der posttranslationalen Translokation von Proteinen in das ER beteiligt ist (Übersichtsartikel: Rapoport *et al.*, 1999). Welche Funktion Sec62p in diesem Prozess ausübt, konnte bisher nicht im Detail geklärt werden. Durch Untersuchungen an einem Hefestamm mit einer konditionalen Mutante von *SEC62* (*sec62-1*) wurde jedoch deutlich, dass die Anwesenheit des Proteins wichtig für die Translokation von Proteinen in das ER ist. Bei Beeinträchtigung der Funktion von Sec62p akkumulieren Vorläufer einiger Proteine, die für den Transport in das ER bestimmt sind, im Zytosol (Rothblatt *et al.*, 1989; Deshaies und Schekman, 1989; Ng *et al.*, 1996). Weiterhin konnte durch biochemische Methoden wie die chemische Kreuzvernetzung, eine Nähe von Sec62p zu Proteinen während ihres Transportes in das ER *in vitro* nachgewiesen werden (Plath *et al.*, 1998). Zunächst wurde in dieser Arbeit versucht, diese Nähe mit Hilfe des Split-Ub-Systems in der lebenden Zelle zu detektieren.

3.1 Die Nähe zwischen Sec62p und Proteinen, die in das ER transloziert werden, kann mit dem Split-Ub-System gemessen werden.

Um die Nähe von Sec62p und den Translokationssubstraten auf ihrem Weg in das ER mit dem Split-Ub-System zu messen, mussten zuerst die benötigten Fusionsproteine erstellt werden. Hierzu wurden Sec62p und eine Reihe anderer Proteine am N-Terminus mit dem N_{ub} fusioniert. Als Translokationssubstrat diente ein Fusionsprotein, das an seinem N-Terminus die ER-Signalsequenz des Paarungspheromones σ -Faktor der Hefe trägt, gefolgt vom C_{ub} und einem Reporterprotein, der Dihydrofolatreduktase, die mit einem HA-Epitop zur immunologischen Detektion versehen wurde (Dha). Die verwendeten Fusionsproteine sind in der Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

A N_{ub}-Fusionsproteine

B C_{ub}-Fusionsproteine

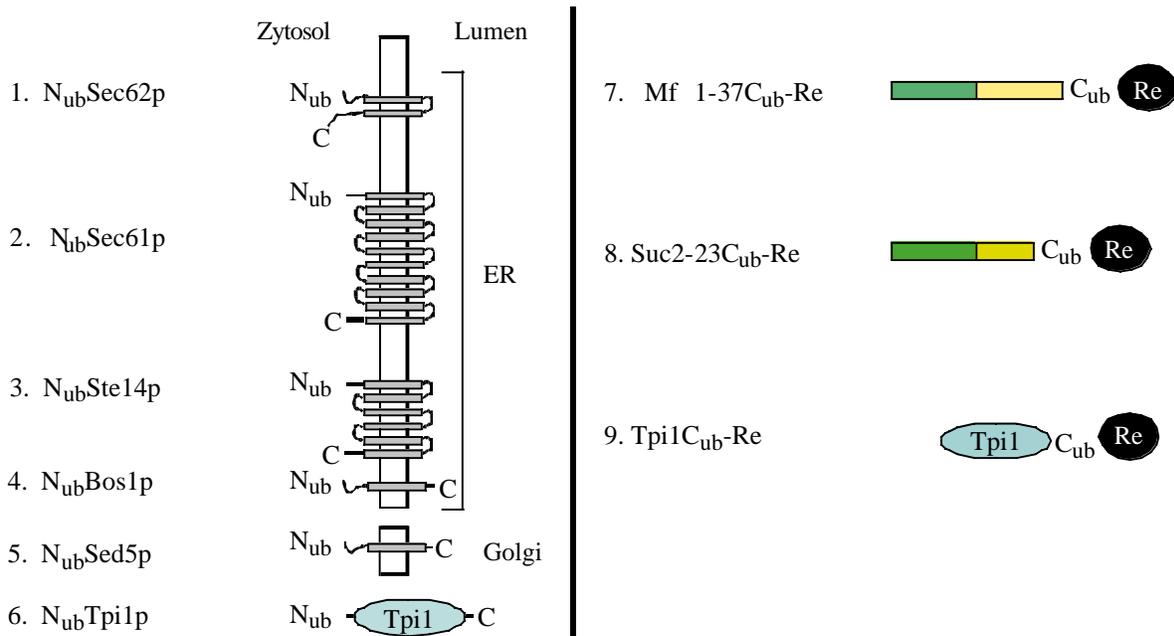


Abb. 3.1 Die N_{ub}- und C_{ub}-Fusionsproteine. Dargestellt sind die in den nachfolgenden Experimenten verwendeten Fusionsproteine. **A** Alle N_{ub}-Fusionsproteine tragen die Nub-Erweiterung an deren N-Terminus. Die Topologie und die Lokalisation innerhalb der Zelle der verwendeten Fusionsproteine ist angegeben. **B** Bei den C_{ub}-Fusionsproteinen mit N-terminaler Signalsequenz deutet der erste Abschnitt des Proteins die eigentliche Signalsequenz an (grüner Abschnitt), während der gelbe Abschnitt den Teil des Fusionsproteins darstellt, der vom N-Terminus des nativen Proteins (-Faktor oder Invertase) abgeleitet wurde. Hierbei wurden die ersten 23 Aminosäuren der Invertase bzw. die ersten 37 Aminosäuren des -Faktors verwendet. Eine genauere Erklärung erfolgt im Text (s. auch Materialien und Methoden).

Das C_{ub}-Translokationssubstrat wird vom Ribosom in das Zytosol synthetisiert. Die N-terminale Signalsequenz interagiert mit Komponenten der Translokationsmaschinerie, um in das Lumen des ER befördert zu werden. Das unmittelbar der Signalsequenz folgende C_{ub} kann somit nur für einen begrenzten Zeitraum mit N_{ub}-Fusionsproteinen im Zytosol reagieren. Es wurde daher erwartet, dass nur die N_{ub}-Fusionsproteine, die sich in der Nähe des Translokons befinden oder Teil des Translokationsapparates sind, mit dem C_{ub}-Translokationssubstrat zu einer Reassoziaton zum kompletten Ubiquitin führen können (Abb. 3.2 **B**). Nub-Fusionsproteine, die nicht an der Translokation beteiligt sind, sollten auch nicht zu einer effizienten Reassoziaton der beiden Ubiquitinhälften führen (Abb. 3.2 **A**).

Ob eine Interaktion zwischen dem C_{ub} -Translokationssubstrat und den jeweiligen N_{ub} -Fusionsproteinen stattfindet, kann über den Anteil abgespaltenen Reporterproteins nachgewiesen werden.

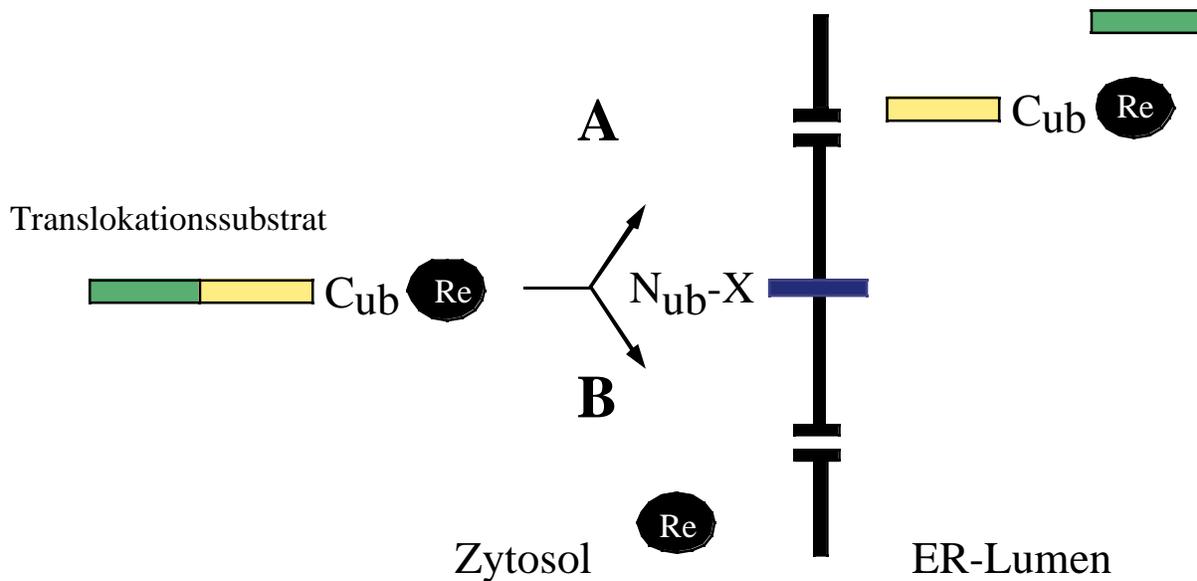


Abb. 3.2 Das Split-Ub-System bei der Untersuchung der ER-Translokation. Um die Translokation von Proteinen in das ER zu untersuchen, werden ein C_{ub} -Translokationssubstrat (s. Abb 3.1 **B**) mit einer N-terminalen Signalsequenz (grüner Abschnitt) und ein N_{ub} -Fusionsprotein (N_{ub} -X) in einer Zelle exprimiert. Nun sind zwei Szenarien denkbar. **A** Zum einen kann das C_{ub} -Translokationssubstrat nicht mit dem N_{ub} -X interagieren. Die beiden Ubiquitinhälften reassoziieren nicht und das Translokationssubstrat wird in das ER transportiert. Dort wird die Signalsequenz durch die Signalpeptidase abgespalten. **B** Zum anderen kann es sich bei N_{ub} -X um ein Protein handeln, das mit dem Translokationssubstrat interagieren kann. Bei dieser Wechselwirkung haben das C_{ub} des Translokationssubstrates und das N_{ub} des N_{ub} -X die Möglichkeit, zum vollständigen Ubiquitin zu reassoziieren. Die Ubps spalten das Reporterprotein (RE) ab und dieses ist im Zytosol nachzuweisen. Das vom Reporter abgetrennte C_{ub} -Translokationssubstrat konnte hier nicht mehr nachgewiesen werden.

3.1.1 Die Funktionalität des $N_{ub}Sec62p$

Um zu testen, ob das $N_{ub}Sec62p$ seine Rolle bei der Translokation genauso wie das unmodifizierte $Sec62p$ wahrnehmen kann, wurde ein Funktionalitätstest durchgeführt. Hierzu diente der Hefestamm RSY 529, der ein temperatursensitives Allel von *SEC62* (*sec62-1*) trägt (Deshaies und Schekman, 1990). Bei 35°C ist das Wachstum von RSY 529-Zellen stark eingeschränkt (semipermissive Temperatur). RSY 529-Zellen wurden mit Plasmiden, von denen entweder unmodifiziertes $Sec62p$ (Abb. 3.3, Reihe 2), oder $N_{ub}Sec62p$ exprimiert werden (Abb. 3.3, Reihe 3), transformiert und das Wachstum dieser Transformanden bei 35°C verglichen. Als Kontrolle dienten RSY 529-Zellen, die nur mit dem Leerplasmid transformiert wurden (Abb. 3.3, Reihe 1).

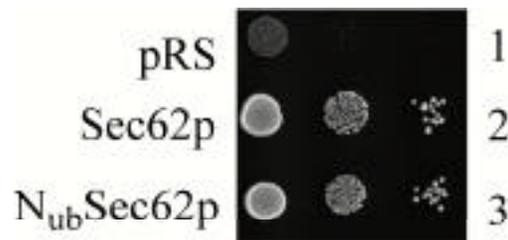


Abb. 3.3 Die Funktionalität des $N_{ub}Sec62p$ -Fusionsproteins. Hefezellen des Stammes RSY 529, die ein temperatursensitives Allel von *SEC62* enthalten (*sec62-1*), wurden mit dem Leervektor (1), einem Plasmid, das das unmodifizierte $Sec62p$ (2) oder das $N_{ub}Sec62p$ exprimiert (3), transformiert, in Flüssigmedium bei 25°C angezogen und in Verdünnungen von 10^5 , 10^3 und 10^2 Zellen auf eine SD-Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei der für diesen Hefestamm semipermissiven Temperatur von 35°C zwei Tage lang.

Es besteht kein Wachstumsunterschied zwischen den Zellen, die $Sec62p$ oder $N_{ub}Sec62p$ exprimieren (Abb. 3.3, Reihe 2 bzw. 3). Im Gegensatz dazu können die Zellen, die nur das Leerplasmid enthalten, bei 35°C kaum noch wachsen (Abb. 3.3, Reihe 1). Es handelt sich also bei dem $N_{ub}Sec62p$ -Fusionsprotein um eine funktionelle Version des $Sec62p$.

Für die C_{ub} -Translokationssubstrate wurde an anderer Stelle getestet, dass sie effizient in das ER transportiert werden (Dünnwald *et al.*, 1998).

3.1.2 N_{ub}Sec62p und N_{ub}Sec61p zeigen eine spezifische Nähe zum Translokationssubstrat Mf α 1-37C_{ub}-Dha

Im eigentlichen Experiment wurden die Fusionsproteine N_{ub}Sec62p und Mf 1-37C_{ub}-Dha in Wildtyp-Hefezellen koexprimiert. Zum Nachweis des Reporterproteins Dha wurde ein Western-Blot mit Proteinextrakten aus Zellen, die beide Fusionsproteine exprimieren, angefertigt (Abb. 3.4, Spuren 1 und 2). Hierbei wurde zwei verschiedene Formen des N_{ub}Sec62p verwendet. Entweder wurde der ORF des Fusionsproteins in das Genom der Hefe integriert (Spur 1), oder N_{ub}Sec62p wurde von einem extrachromosomalen Plasmid exprimiert (Spur 2). Als Referenz diente das N_{ub}Sec61p. Da Sec61p der Kanal ist, durch den alle Translokationssubstrate in das ER transportiert werden, sollte die Nähe zwischen Mf 1-37C_{ub}-Dha und N_{ub}Sec61p zu messen sein (Abb. 3.3, Spur 4). Als Negativkontrolle diente in diesem Experiment ein Fusionsprotein, das eine nichtfunktionelle Deletionsmutante des Sec62p mit der N_{ub}-Erweiterung trägt (N_{ub}Sec62(C60)Dha, Abb. 3.3, Spur 3, zur Charakterisierung dieser Mutante s. Abschnitt 3.3).

Anhand des abgespaltenen Reporterproteins Dha, das sowohl bei der Koexpression von N_{ub}Sec62p (Abb. 3.4, Spur 1 und 2) und dem C_{ub}-Translokationssubstrat, als auch bei der gleichzeitigen Expression von N_{ub}Sec61p (Spur4) und dem C_{ub}-Translokationssubstrat auftritt, kann abgeleitet werden, dass diese N_{ub}-Fusionsproteine in die Nähe von Mf 1-37C_{ub}-Dha gelangen. Das Signal, das durch die gleichzeitige Expression der genomisch integrierten Version des N_{ub}Sec62p und Mf 1-37C_{ub}-Dha verursacht wird (Spur 1), ist hierbei stärker als das, das durch das extrachromosomal exprimierte N_{ub}Sec62p verursacht wird (Spur 2). Die genomisch integrierte Version des N_{ub}Sec62p ist das einzige Sec62p in der Zelle. Das vom Plasmid aus exprimierte N_{ub}Sec62p hingegen konkurriert mit der zellulären Version des Sec62p um alle Interaktionspartner. Somit ist auch die Interaktion mit dem C_{ub}-Translokationssubstrat im Vergleich zum chromosomalen N_{ub}Sec62p abgeschwächt.

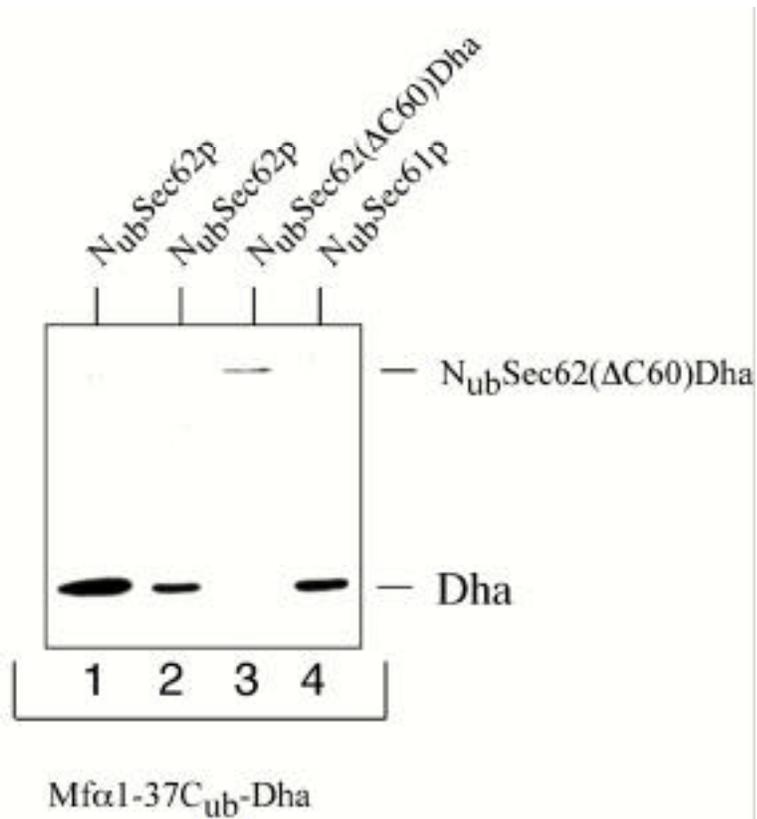


Abb. 3.4 Die Proximität von $N_{ub}Sec62p$ - und $N_{ub}Sec61p$ -Fusionsproteinen zu $Mf\alpha 1-37C_{ub}$ -Dha. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen N_{ub} -Fusionsproteine zusammen mit $Mf 1-37C_{ub}$ -Dha exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des Reporterproteins erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. Für dieses Experiment wurden zwei verschiedene Versionen des $N_{ub}Sec62$ -Fusionsproteins verwendet: die eine ist genomisch integriert (Spur 1), während sich die andere auf einem extrachromosomalen Plasmid befindet (Spur 2).

Keine oder eine nur sehr schwache Wechselwirkung ist zwischen dem Translokationssubstrat und $N_{ub}Sec62(\Delta C60)Dha$ nachzuweisen (Spur 3). Die Nähe von $Sec62p$ zu einem Translokationssubstrat kann also mittels des Split-Ub-Systems in der lebenden Zelle nachgewiesen werden.

Erstaunlicherweise konnte das in das ER gelangte C_{ub} -Translokationssubstrat nicht auf dem Western-Blot detektiert werden (Abb. 3.4, Spur 3). Dies liegt an der Instabilität dieses Fusionsproteines in den sekretorischen Kompartimenten. Mit sensibleren Meßmethoden kann allerdings auch dieses Protein eindeutig nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.1.1).

Eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Interpretation der verschiedenen N_{ub} - C_{ub} -Reassoziationen ist, dass alle miteinander verglichenen N_{ub} -Fusionsproteine etwa gleich stark exprimiert werden und sie in gleicher Weise mit einem neutralen C_{ub} -Fusionsprotein, das nicht in das ER transloziert wird, interagieren können.

Dazu wurde ein zytosolisches Protein, an das C_{ub} und das Reporterprotein fusioniert wurde, verwendet. Hierbei handelt es sich um das Protein Tpi1p, die Triosephosphatisomerase der Hefe (Abb.3.1) (Alber und Kawasaki, 1982). Tpi1 C_{ub} -Dha wurde mit den selben N_{ub} -Fusionsproteinen wie in Abb. 3.4 koexprimiert (Abb. 3.5).

Alle N_{ub} -Fusionsproteine zeigen einen ähnlichen Grad der Abspaltung des Reporterproteins. Nur die Koexpression der chromosomalen Version des N_{ub} Sec62p vermag hier einen größeren Anteil an Dha freizusetzen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die übrigen N_{ub} -Fusionsproteine nicht nur ungefähr gleich stark exprimiert werden, sondern auch alle die gleiche Fähigkeit zur Reassoziaton mit einem neutralen C_{ub} -Fusionsprotein besitzen.

Die Spezifität der Reaktion zwischen N_{ub} Sec62p und dem Translokationssubstrat wurde noch genauer überprüft, indem weitere N_{ub} -Fusionsproteine als Kontrollen eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich um zwei ER-Membranproteine (N_{ub} Bos1p und N_{ub} Ste14p), ein Golgi-Membranprotein (N_{ub} Sed5p) und das bereit erwähnte zytosolische Protein Tpi1p (N_{ub} Tpi1p) (Abb. 3.1). Bos1p ist ein V-SNARE, das am Vesikelverkehr zwischen ER und Golgi beteiligt ist (Newman *et al.*, 1992). Ste14p ist eine Carboxymethyltransferase. Sie methyliert isoprenylierte Proteine an ihrem C-Terminus (Romano *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 1999). Sed5p ist ebenfalls ein SNARE-Protein und übt seine Funktion beim Vesikelverkehr innerhalb der Golgi-Cisternen aus (Banfield *et al.*, 1994). Alle diese Proteine sind nicht an der ER-Translokation beteiligt und sollten daher keine spezifische Nähe zum C_{ub} -Translokationssubstrat aufweisen.

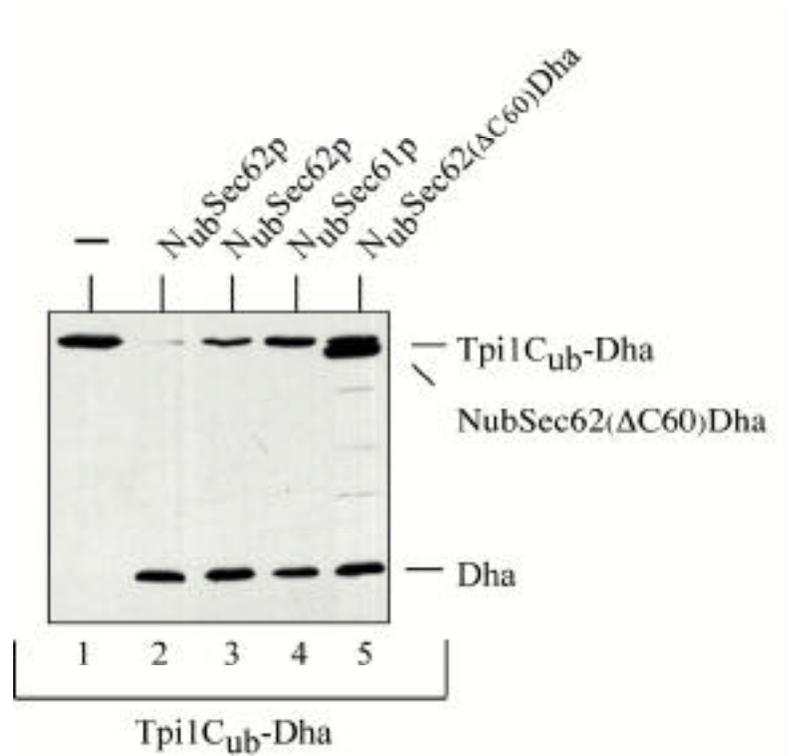


Abb. 3.5 Die Interaktion eines neutralen C_{ub}-Fusionsproteins mit den verschiedenen N_{ub}-Sec-Fusionsproteinen. Wildtyp-Hefezellen, die Tpi1C_{ub}-Dha zusammen mit den angegebenen N_{ub}-Fusionsproteinen exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des Reporterproteins (Dha) erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. Erneut wurden die genomisch integrierte (Spur 2) und die von einem extrachromosomalen Plasmid exprimierte Version des N_{ub}Sec62p verwendet (Spur 3).

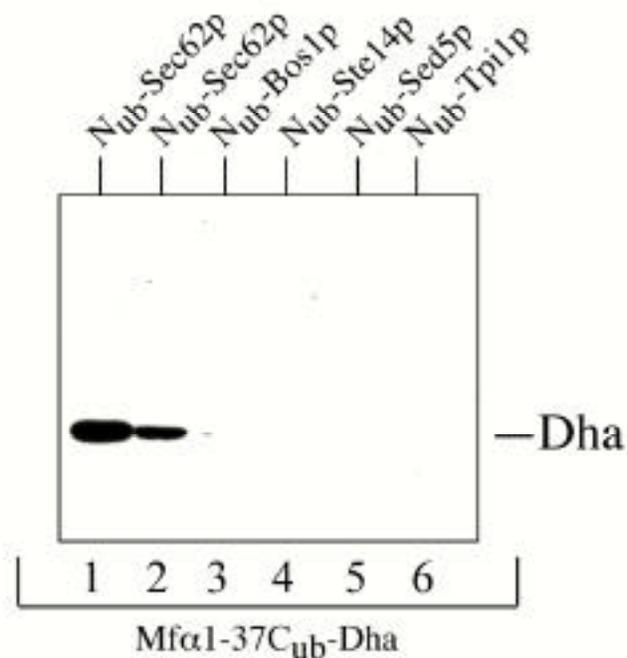


Abb. 3.6 Die Spezifität der Interaktion von $N_{ub}Sec62p$ mit $Mf\alpha1-37C_{ub}-Dha$. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen N_{ub} -Fusionsproteine zusammen mit $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des Reporterproteins (Dha) erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. Wieder sind zwei verschiedene Versionen des $N_{ub}Sec62$ -Fusionsproteins verwendet worden: die chromosomal exprimierte Version des $N_{ub}Sec62p$ ist in Spur 1 abgebildet, während sich das extrachromosomal exprimierte $N_{ub}Sec62p$ in Spur 2 befindet.

Die nicht an der Translokation beteiligten N_{ub} -Fusionsproteine zeigten im Vergleich zu $N_{ub}Sec61p$ und $N_{ub}Sec62p$ keine Nähe zu $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ (Abb. 3.6). Lediglich $N_{ub}Bos1p$ vermag eine geringe Menge des Reporterproteins freizusetzen (Spur 3).

Wieder wurde das Expressionsniveau und die Fähigkeit, mit einem neutralen C_{ub} -Fusionsprotein zu reassoziieren, für alle N_{ub} -Fusionsproteine mit Hilfe von $Tpi1C_{ub}-Dha$ überprüft.

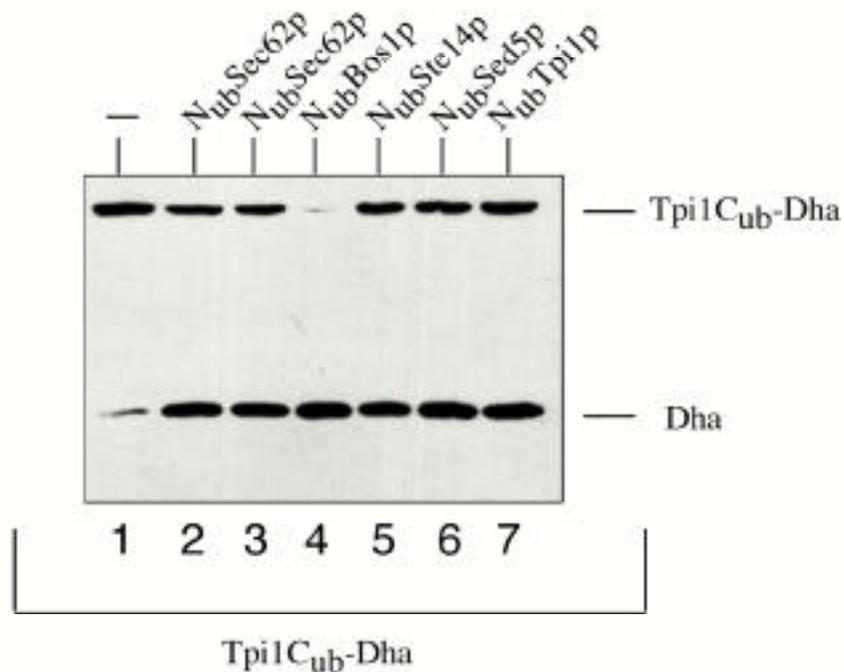


Abb. 3.7 Die Interaktion eines neutralen C_{ub} -Fusionsproteins mit den verschiedenen N_{ub} -Fusionsproteinen. Wildtyp-Hefezellen, die Tpi1 C_{ub} -Dha zusammen mit den angegebenen N_{ub} -Fusionsproteinen exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des Reporterproteins (Dha) erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. Wieder sind die chromosomal (1) und die extrachromosomal (2) exprimierte Versionen des N_{ub} Sec62p verwendet worden.

Alle verwendeten N_{ub} -Fusionsproteine reagieren ähnlich stark mit Tpi1 C_{ub} -Dha. Die Reassoziationsreaktion zwischen N_{ub} Bos1p und Tpi1 C_{ub} -Dha ist besonders stark, da hier kaum noch ungespaltenes Tpi1 C_{ub} -Dha nachzuweisen ist (Abb. 3.7, Spur 4). Dies scheint an der sehr hohen Expressionsrate des N_{ub} Bos1p zu liegen, die auch schon an anderer Stelle gezeigt werden konnte (S. Wittke, persönliche Mitteilung). Bei der starken Exposition des Blots in Abb. 3.7 ist auch bei der alleinigen Expression von Tpi1 C_{ub} -Dha ein geringer Anteil an abgespaltenem Dha zu detektieren (Spur 1). Dies mag daran liegen, dass beim normalen zellulären Abbau des Tpi1 C_{ub} -Dha das Dha freigesetzt wird oder die Ubps das C_{ub} alleine in sehr eingeschränktem Maße erkennen und den Reporter daraufhin abspalten können. Da aber die Menge an abgespaltenem Dha hier sehr viel geringer ist als bei der Koexpression mit den N_{ub} -Fusionsproteinen, kann Tpi1 C_{ub} -Dha als Referenzprotein dienen.

Damit bestätigt der Vergleich mit anderen N_{ub} -Fusionsproteinen, dass die Reaktion von $N_{ub}Sec62p$ mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha spezifisch ist. Das ist der erste Nachweis der transienten Interaktion zwischen einem Translokationssubstrat und einer Komponente des Translokationsapparates *in vivo*.

3.1.3 Die Quantifizierung der Reaktionen von N_{ub} -Fusionsproteinen mit $Mf\alpha 1-37C_{ub}$ -Dha

Durch eine Variante des experimentellen Systems sollte die Spezifität der Reaktion zwischen $N_{ub}Sec62p$ und $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha quantifiziert werden. Da vermutlich die Detektion radioaktiv markierter Proteine wesentlich sensitiver ist als die bisher gezeigten Western-Blot-Analysen, sollte so auch möglich sein, das translozierte C_{ub} -Fusionsprotein nachzuweisen. Das Verhältnis von transloziertem, also ungespaltenem Translokationssubstrat, zu abgespaltenem Dha kann als Maß für die Interaktion oder Proximität von $N_{ub}Sec62p$ und $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha dienen.

$N_{ub}Sec61p$, $N_{ub}Sec62p$ und $N_{ub}Bos1p$ wurden mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha koexprimiert, die Zellen radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die Proteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert (Abb.3.8 A).

Auf dem Autoradiogramm ist klar zu erkennen, dass $N_{ub}Sec61p$ und $N_{ub}Sec62p$ deutlich mehr abgespaltenes Dha induzieren können als $N_{ub}Bos1p$. Bei der mit * gekennzeichneten Bande handelt es sich wahrscheinlich um nicht oder noch nicht transloziertes Translokationssubstrat, das vor allem in den Zellen auftritt, die $N_{ub}Sec61p$ als einziges funktionelles $Sec61p$ exprimieren (Abb. 3.8, Spur1).

Die Auswertung der Daten dieser Experimente (Abb. 3.8 B) läßt einen quantitativen Vergleich zwischen den Interaktionen der unterschiedlichen N_{ub} -Fusionsproteine mit dem C_{ub} -Translokationssubstrat zu. Dazu wird die Menge an transloziertem Protein und abgespaltenem Dha als 100 gesetzt und der Anteil an Dha davon in Prozent angegeben. Hieraus geht hervor, dass die Koexpression von $N_{ub}Sec62p$ mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha ungefähr 20 Mal mehr abgespaltenes Dha produziert als die Koexpression von $N_{ub}Bos1p$ mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha. $N_{ub}Sec61p$ zeigt die stärkste Reassoziationsrate mit dem Translokationssubstrat. Mit Hilfe dieser Analyse kann somit die Nähe zwischen einem Translokationssubstrat und einem beliebigen Protein abgeschätzt werden.

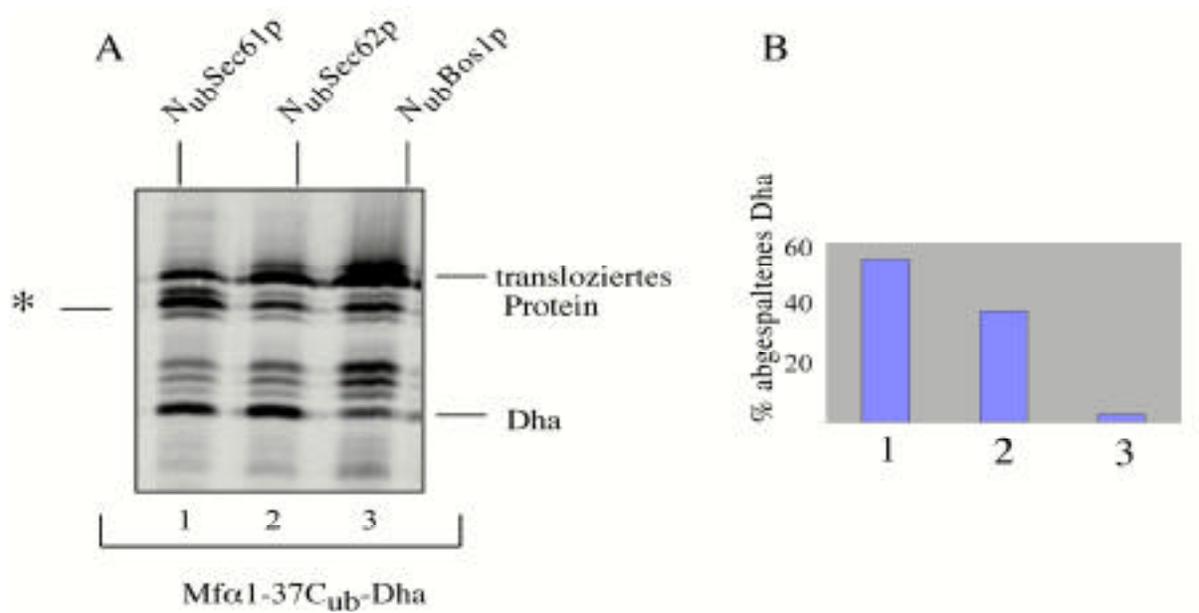


Abb. 3.8 Die Quantifizierung der Reaktion zwischen Mf α 1-37C_{ub}Dha und den N_{ub}-Fusionsproteinen.

A Wildtyp-Hefezellen, die die angezeigten N_{ub}-Fusionsproteine zusammen mit Mf 1-37C_{ub}-Dha exprimieren, wurden mit ³⁵S Methionin für 5 min radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die mit dem HA-Epitop versehenen Fusionsproteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für vier Tage exponiert. Der Ursprung der mit * gekennzeichneten Bande kann nicht eindeutig identifiziert werden (s. Text). **B** Die Quantifizierung des Experimentes in **A** erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers. Drei unabhängige Experimente wurden ausgewertet. Die Summe aus transloziertem Protein und abgespaltenem Dha für jeder Spur wurde als 100 gewertet und das abgespaltene Dha in Prozent angegeben. Der mittlere quadratische Fehler der aus den drei Experimenten gewonnenen Mittelwerte lag immer unter 5%.

3.2 Die Interaktion zwischen Translokationssubstraten und Sec62p wird von der Identität der Signalsequenz beeinflusst

Die Beschaffenheit der Signalsequenz der Proteine, die in das ER transportiert werden, entscheidet über den Modus ihrer Translokation (Ng *et al.*, 1996). Die Proteine mit hydrophoberen Signalsequenzen bevorzugen den kotranslationalen Translokationsweg unter Mitwirkung des SRP. Die weniger hydrophoben Signalsequenzen führen zur posttranslationalen Translokation, die mit Hilfe des tetrameren Sec-Komplexes ausgeführt wird. Dies sollte zur Folge haben, dass die Proteine des tetrameren Sec-Komplexes verstärkt mit solchen Proteinen interagieren, die weniger hydrophobe ER-Signalsequenzen tragen. Diese Vermutung wurde mit dem Split-Ub-System überprüft.

3.2.1 N_{ub}Sec62p interagiert mit Mf α 1-37C_{ub}-Dha stärker als mit Suc2-23C_{ub}-Dha

Die Signalsequenz der Invertase aus Hefe (Suc2p) wurde für die folgenden Experimente ausgewählt. Sie ist hydrophober als die schon vorher verwendete Signalsequenz des α -Faktors (Ng *et al.*, 1996). Es wurde verglichen, wie die beiden unterschiedlichen C_{ub}-Translokationssubstrate Mf 1-37C_{ub}-Dha und Suc2-23C_{ub}-Dha mit N_{ub}Sec62p interagieren. Hierzu wurde N_{ub}Sec62p mit jeweils einem der beiden Translokationssubstrate koexprimiert. Als Referenz sollte wieder N_{ub}Sec61p dienen, da alle Proteine, die in das ER gelangen, mit diesem Protein in Kontakt treten sollten. Diese Reaktion sollte von der Beschaffenheit der Signalsequenz unabhängig sein. Hier wurden zum ersten Mal die in der Einleitung erwähnten Mutanten des N_{ub}, N_{ua} und N_{ug}, verwendet. Ihr Einsatz sollte eine bessere Differenzierung der Stärke der Interaktionen erlauben. Die Affinität des N_{ua} zum C_{ub} ist im Vergleich zum N_{ub} herabgesetzt. Nur eine starke Aufkonzentration der beiden Ubiquitinhälften durch die Fusion an miteinander interagierende Proteine kann zur nachweisbaren Reassoziaton des Ubiquitin führen. Die Mutante N_{ug} hat im Vergleich zu N_{ua} eine noch schwächere Affinität zum C_{ub}.

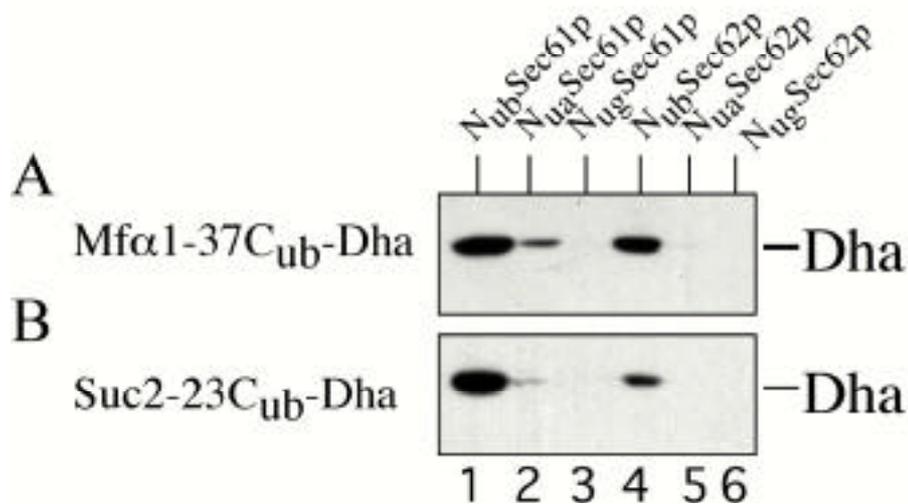


Abb. 3.9 Die Interaktion von $N_{ub}Sec61p$ und $N_{ub}Sec62p$ mit C_{ub} -Translokationssubstraten mit unterschiedlichen Signalsequenzen Hefezellen, die die angegebenen N_{ub} -Fusionsproteine (N_{ub} = Wildtyp, N_{ua} und N_{ug} = Mutanten) zusammen mit Mf 1-37 C_{ub} -Dha (A) oder mit Suc2-23 C_{ub} -Dha (B) exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

Die sechs Fusionsproteine $N_{ub}Sec61p$, $N_{ua}Sec61p$ und $N_{ug}Sec61p$ sowie $N_{ub}Sec62p$, $N_{ua}Sec62p$ und $N_{ug}Sec62p$ wurden jeweils mit den beiden Translokationssubstraten Mf 1-37 C_{ub} -Dha und Suc2-23 C_{ub} -Dha koexprimiert. In der Western-Blot-Analyse in Abb. 3.9 ist zu erkennen, dass die N_{ug} -Fusionsproteine keine Reaktion mit den verwendeten C_{ub} -Fusionsproteinen zeigen (Spur 3 und 6). Bei den N_{ua} -Fusionsproteinen ist lediglich eine geringe Menge abgespaltenen Reporters bei der Koexpression der Sec61p-Fusionsproteine mit den Translokationssubstraten zu detektieren (Spur 2). Da die Interaktion der Sec-Proteine mit den Translokationssubstraten sehr transient ist, haben die N_{ua} -Mutanten kaum Gelegenheit zur Reassoziierung mit dem C_{ub} . Die N_{ua} - und N_{ug} -Fusionsproteine eignen sich somit viel mehr zur Detektion sehr starker Protein-Protein-Wechselwirkungen, etwa innerhalb eines Protein-Komplexes (Wittke *et al.*, 1999). Betrachtet man die Spezifität der Interaktion von $N_{ub}Sec61p$ und $N_{ub}Sec62p$ mit den beiden Translokationssubstraten in Bezug auf die verschiedenen Signalsequenzen, so kann festgestellt werden, dass die Signale für Mf 1-37 C_{ub} -Dha (Abb.3.8 B) insgesamt stärker sind, als die für

Suc2-23C_{ub}-Dha (A). Die Interaktion zwischen den N_{ub}-Fusionsproteinen und Mf 1-37C_{ub}-Dha, das bedeutet auch zwischen N_{ub}Sec62p und Mf 1-37C_{ub}-Dha, scheint damit zu dominieren.

Dieses Ergebnis wurde durch eine genauere Analyse überprüft. Dazu wurde die in Abschnitt 3.1.3 dargelegte Strategie erneut angewandt. Hefezellen, die entweder die verschiedenen Translokationssubstrate alleine oder zusammen mit N_{ub}Sec61p oder N_{ub}Sec62p exprimieren, wurden mit Hilfe der radioaktiven Markierung und der Immunpräzipitation untersucht.

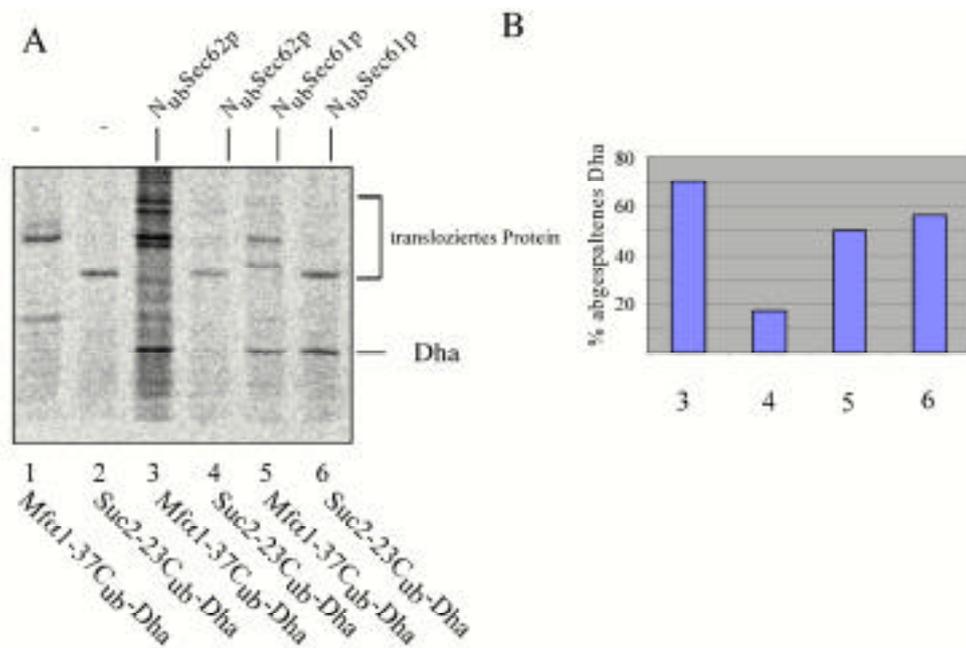


Abb. 3.10 Die Abhängigkeit der Proximität zwischen N_{ub}Sec62p und den C_{ub}-Translokationssubstraten von der Signalsequenz. A Wildtyp-Hefezellen, die die Translokationssubstrate Mf 1-37C_{ub}-Dha oder Suc2-23C_{ub}-Dha alleine oder mit den angegebenen N_{ub}-Fusionsproteinen exprimieren, wurden mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die mit dem HA-Epitop versehenen Fusionsproteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für drei Tage exponiert. B Die Quantifizierung der Experimente wie in A (nur mit den Zellen, die N_{ub}-Fusionsproteine mit den C_{ub}-Translokationssubstraten koexprimieren) erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers. Zur Quantifizierung wurden drei unabhängige Experimente herangezogen. Die Summe aus transloziertem Protein und abgespaltenem Dha wurde als 100 gesetzt. Der Anteil an abgespaltenem Dha ist in Prozent angegeben. Der mittlere quadratische Fehler der ermittelten Werte aus den drei Experimenten lag immer unter 7%.

Das Autoradiogramm in Abb. 3.10 **A** zeigt zum einen, dass die Expression der beiden Translokationssubstrate auf etwa gleichem Niveau liegt (Spur 1 und 2). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für den Vergleich der Signale, die aus der Interaktion der beiden verschiedenen Translokationssubstrate mit N_{ub}Sec62p und N_{ub}Sec61p hervorgehen. Betrachtet man nämlich die Signale in den Spuren 3 und 4 der Abb. 3.9 **A**, so fällt auf, dass hier bei der Koexpression von N_{ub}Sec62p und Mf 1-37C_{ub}-Dha gespaltenes Dha zu sehen ist. Die Koexpression von N_{ub}Sec62p und Suc2-23C_{ub}-Dha führt jedoch, wenn überhaupt, nur zu einem äußerst schwachen Dha-Signal. Das Referenzprotein N_{ub}Sec61p scheint mit beiden Translokationssubstraten ungefähr gleich stark zu interagieren. Wieder dient die Quantifizierung mehrerer Experimente zur Abschätzung der Unterschiede der betrachteten Reaktionen (Abb. 3.10 **B**). Auch hieraus geht hervor, dass die Interaktion zwischen N_{ub}Sec62p und Mf 1-37C_{ub}-Dha um ein Vielfaches stärker ist als die zwischen N_{ub}Sec62p und Suc2-23C_{ub}-Dha. Es kann also mit Hilfe des Split-Ub-Systems gezeigt werden, dass Translokationssubstrate mit einer weniger hydrophoben Signalsequenz, wie die des -Faktors bevorzugt mit einer Komponente des tetrameren Sec-Komplexes, dem Sec62p, interagieren. Der geringe Unterschied im Vergleich der beiden C_{ub}-Translokationssubstrate im Western-Blot (Abb. 3.9) begründet sich aus der starken Akkumulation des Reporters Dha unter diesen experimentellen Bedingungen. Bei der Pulse-Analyse in Abb. 3.10 ist dieses Problem umgangen, da nur Proteine betrachtet werden, die in einem definierten Zeitraum synthetisiert worden sind.

3.2.2 Ein Wachstumstest zur Untersuchung der Interaktion zwischen Sec-Proteinen und Translokationssubstraten mit Hilfe des Split-Ub-Systems

Um die Ergebnisse, die durch die Anwendung des Split-Ub-Systems ermittelt worden sind, zu untermauern, wurde ein anderes Reporterprotein ausgewählt. Hierbei handelt es sich um das Ura3p, die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase. Dieses Enzym ist an der Synthese des Uracils beteiligt und wurde schon zuvor in der Untersuchung von Translokationsvorgängen in lebenden Zellen verwendet (Maarse *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1996). Hefezellen können ohne die enzymatische Aktivität des Ura3p nicht auf Medium, das kein Uracil enthält, wachsen. Ura3p übt

seine Funktion im Zytosol der Hefezellen aus. N-terminale Fusionen an Ura3p stören dessen enzymatische Aktivität nicht meßbar.

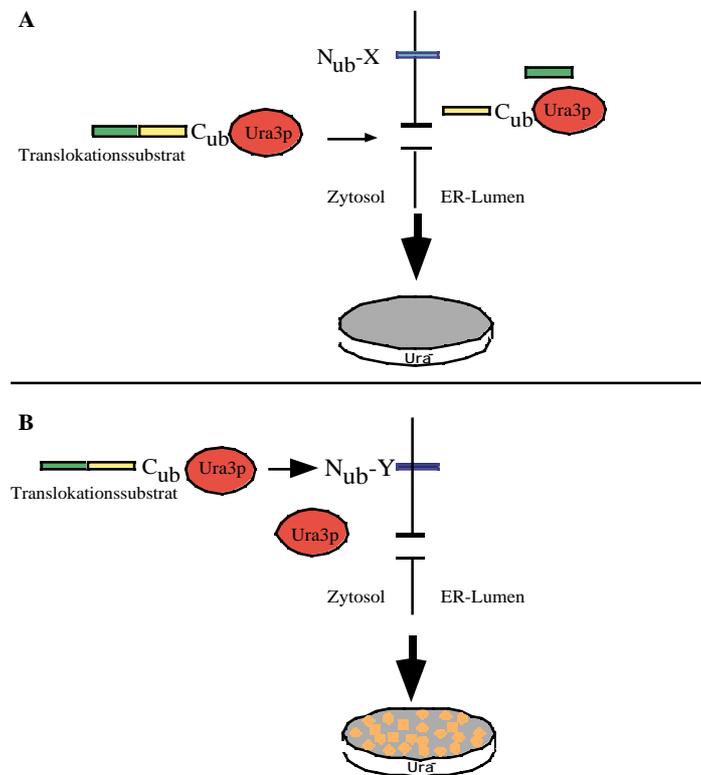


Abb. 3.11 Ura3p als Reporter für die Untersuchung der ER-Translokation mit Hilfe des Split-Ub-System. **A** Das Translokationssubstrat kann nicht mit dem N_{ub} -X-Fusionsprotein interagieren und wird in das ER transloziert. Die Signalsequenz des Translokationssubstrates wird prozessiert, Ura3p ist im Lumen des ER und die Hefezellen können nicht auf Platten ohne Uracil wachsen. **B** Das Translokationssubstrat kann mit N_{ub} -Y interagieren, N_{ub} und C_{ub} reassoziieren und die Ubps spalten Ura3p ab. Ura3p befindet sich damit im Zytosol und die Hefezellen können auf Uracil-freiem Medium wachsen.

Ein Fusionsprotein, bestehend aus einer N-terminalen ER-Signalsequenz, dem C_{ub} und dem daran fusionierten Ura3p, wird in Zellen exprimiert, die kein zusätzliches Ura3p enthalten. Diese Zellen können nur dann auf Uracil-freiem Medium wachsen, wenn sich das Fusionsprotein mit dem Ura3p im Zytosol befindet. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Es besteht die Möglichkeit, dass etwa durch einen Translokationsdefekt das Translokationssubstrat mit dem Ura3p-Reporter im Zytosol akkumuliert. Das Split-Ub-System kann aber auch hier eine Anwendung finden (Abb.

3.11). Das Translokationssubstrat mit C_{ub}-Ura3p wird zusammen mit einem N_{ub}-Fusionsprotein exprimiert. Wenn das N_{ub}-Fusionsprotein und das Translokationssubstrat sich nahe genug kommen, können N_{ub} und C_{ub} reassoziieren. Das führt zur Abspaltung des Ura3p durch die Ubps. Ura3p trägt nun keine Signalsequenz mehr und verbleibt im Zytosol. Somit können die Zellen auf Uracil-freiem Medium wachsen (Abb.3.11 **B**). Kann das N_{ub}-Fusionsprotein aber nicht mit dem Translokationssubstrat interagieren, so wird es in das Lumen des ER transportiert, die Zellen besitzen keine Ura3p-Aktivität im Zytosol und können somit auch nicht auf Uracil-freiem Medium wachsen (Abb. 3.11 **A**). Auf diese Weise kann ein Wachstumstest von Zellen auf Medien, die kein Uracil enthalten, Auskunft über die Interaktion oder Nähe zwischen N_{ub}- und C_{ub}-Fusionsproteinen liefern.

Die mit dem Dha-Reporterprotein durchgeführten Split-Ub-Experimente wurden mit dem Ura3p als Reporter reproduziert. Die verwendeten Translokationssubstrate weisen eine Besonderheit auf. Neben den N-terminalen Signalsequenzen wurden noch verschieden lange Abschnitte aus den nativen Proteinen N-terminal vor C_{ub}-Ura3p fusioniert. Dies soll eine kinetische Auflösung des Translokationsvorganges ermöglichen (Johnsson und Varshavsky, 1994 b)).

Bei der Synthese der Fusionsproteine erscheint zuerst die Signalsequenz im Zytosol. Wird diese von Komponenten des Translokationsapparates erkannt, beginnt der Transport in das ER. Folgt nun das C_{ub} direkt hinter der Signalsequenz, besteht die Möglichkeit, dass die Translokation noch nicht begonnen hat und das C_{ub} mit einem N_{ub} reassoziieren kann. Dadurch wird das Reporterprotein im Zytosol freigesetzt. Liegt aber ein großer Abschnitt an Aminosäuren zwischen der Signalsequenz und dem C_{ub}, so kann der Transport des Fusionsproteins in das ER anfangen, bevor das C_{ub} überhaupt synthetisiert worden ist. Dann haben N_{ub}-Fusionsproteine keine Gelegenheit, mit dem C_{ub} zu reagieren. Das Fusionsprotein wird während seiner Synthese vollständig in das Lumen des ER geleitet und das Reporterprotein kann nicht abgespalten werden.

Die C_{ub}-Ura3p-Translokationssubstrate wurden entweder mit dem Leervektor oder zusammen mit N_{ub}-Fusionsproteinen in Wildtyp-Hefezellen exprimiert. Nachdem sie in Uracil-haltigem Medium angezogen worden waren, wurden sie in verschiedenen Verdünnungen auf Uracil-freie Platten aufgetragen und bei 30°C inkubiert.

Die Expression aller verwendeten Translokationssubstrate ohne ein N_{ub} -Fusionsprotein kann keine Uracil-Prototrophie vermitteln (Abb. 3.12 **A**). Die Fusionsproteine werden so effizient in das ER transloziert, dass nicht genügend Ura3p-Aktivität im Zytosol verbleibt. Die Zellen können nicht auf den Uracil-freien Platten wachsen. Bei der Koexpression der Ura3p-Translokationssubstrate mit $N_{ub}Sec62p$ ist hingegen bei einigen Transformanden Wachstum zu erkennen. Die Hefezellen, die $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Ura3p zusammen mit $N_{ub}Sec62p$ exprimieren, weisen das höchste Wachstum auf (Abb. 3.12 **B**, Reihe 4). Geringes Wachstum tritt bei den Zellen auf, die $Suc2-23C_{ub}$ -Ura3p und $Suc2-33C_{ub}$ -Ura3p zusammen mit $N_{ub}Sec62p$ exprimieren (Abb. 3.12 **B**, Reihe 1 und 2). Die Koexpressionen von $Suc2-59C_{ub}$ -Ura3p und $Mf\ 1-65C_{ub}$ -Ura3p mit $N_{ub}Sec62p$ vermitteln kein Wachstum (Abb. 3.12, Reihe 3 und 5). $N_{ub}Sec61p$ wurde wieder als Referenzprotein eingesetzt. Bei der Koexpression dieses N_{ub} -Sec-Proteins mit den Ura3p-Translokationssubstrat kann folgendes Wachstumsverhalten beschrieben werden: gutes Wachstum für Zellen, die $N_{ub}Sec61p$ zusammen mit $Suc2-23C_{ub}$ -Ura3p oder $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Ura3p exprimieren (Abb. 3.12 **C**, Reihe 1 und 5); etwas eingeschränktes Wachstum bei den Zellen, die $N_{ub}Sec61p$ zusammen mit $Suc2-33C_{ub}$ -Ura3p oder $Mf\ 1-65C_{ub}$ -Ura3p exprimieren (Reihe 2 und 5); sehr geringes Wachstum bei Zellen, die $N_{ub}Sec61p$ zusammen mit $Suc2-59C_{ub}$ -Ura3p exprimieren (Reihe 3). Als Negativkontrolle diente wieder $N_{ub}Bos1p$ (Abb. 3.12 **D**). Bei der Koexpression dieses N_{ub} -Fusionsproteins mit den C_{ub} -Ura3p-Translokationssubstraten kann, wenn überhaupt, nur sehr schwaches Wachstum beobachtet werden. Die Zellen, die $Suc2-23C_{ub}$ -Ura3p und $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Ura3p mit $NubBos1p$ exprimieren, können nur sehr eingeschränkt wachsen (Reihe 1 und 4).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass auch mit Hilfe des Reporters Ura3p die Spezifität der Interaktion von $N_{ub}Sec62p$ mit einem Translokationssubstrat, das die Signalsequenz des - Faktors trägt, nachzuweisen ist. Darüber hinaus kann auch die Kinetik des Translokationsvorganges gemessen werden. Die Länge der Aminosäurekette zwischen der Signalsequenz und dem C_{ub} -Ura3p übt einen Einfluß auf die Reassoziationsrate von N_{ub} und C_{ub} aus. Längere Abschnitte zwischen den Signalsequenzen und C_{ub} führen bei allen verwendeten C_{ub} -Translokationssubstraten zu einer geringeren Assoziation mit den N_{ub} -Sec-Fusionsproteinen ($N_{ub}Sec61p$ und $N_{ub}Sec62p$).

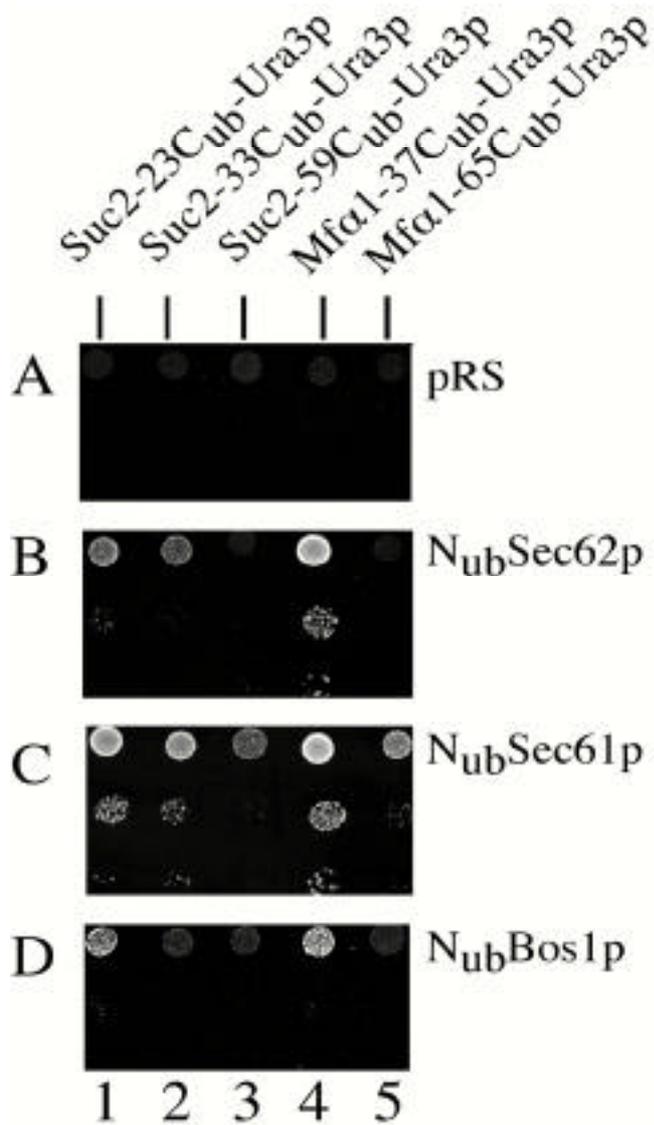


Abb. 3.12 Der Reporter Ura3p zur Untersuchung der Nähe einer Komponente der Translokationsmaschinerie und eines translozierten Proteins. *S. cerevisiae*-Zellen, die die angegebenen Fusionsproteine koexprimieren, wurden in Flüssigmedium, das Uracil enthält, angezogen und in Verdünnungen von 10⁵, 10³ und 10² Zellen auf Platten ohne Uracil aufgetragen. Die Dokumentation der Platte erfolgte nach 18 h.

3.3 Die Mutationsanalyse des Sec62p in Bezug auf die Signalsequenz-Erkennung

Da die Spezifität der Interaktion von $N_{ub}Sec62p$ mit C_{ub} -Translokationssubstraten mit der Signalsequenz des $-$ Faktors gezeigt werden konnte, ergab sich die Frage, welcher Teil des Proteins für diese Reaktion verantwortlich ist. Dazu wurden in einem ersten Schritt fünf verschiedene Deletionsmutanten des Sec62p erstellt. Vier davon besitzen zunehmend große Deletionen am C-Terminus des Proteins, während ein Protein eine Deletion am N-Terminus hat (Abb. 3.13).

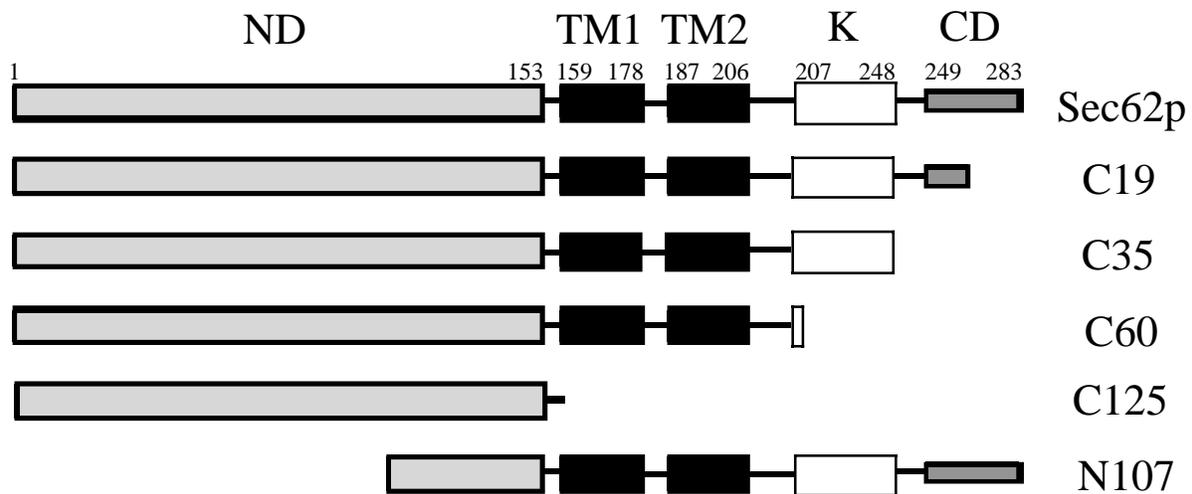


Abb. 3.13 Die schematische Darstellung der Sec62-Deletionsmutanten. Die Domänen des Proteins sind in Blöcken dargestellt. ND = N-terminale Domäne (hellgrau), TM1, TM2 = Transmembrandomäne 1 bzw. 2 (schwarz), K = hochkonservierte Domäne (weiß) und CD = C-terminale Domäne (dunkelgrau). Die Zahlen am unmodifizierten Sec62p geben die Positionen der Aminosäuren an, die die Domänen des Proteins begrenzen.

Getestet wurde die Funktionalität der Deletionsmutanten und die Stärke der Interaktion zwischen den $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten und dem Translokationssubstrat $Mf\ 1-37-C_{ub}-Dha$. Die Mutanten wurden alle C-terminal mit der Dihydrofolatreduktase mit HA-Epitop verlängert, um einen gleichmäßigen Nachweis der Fusionsprotein zu gewährleisten.

3.3.1 Die Funktionalität der Sec62p-Deletionsmutanten

Der Funktionalitätstest der Sec62p-Deletionsmutanten erfolgte wie schon zuvor mit Hilfe des Hefestammes RSY 529 (s. Kapitel 3.1.1). Zellen dieses Stammes wurden mit dem Leerplasmid oder mit Plasmiden, die die angegebenen Deletionsmutanten exprimieren, transformiert. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, das ein unmodifiziertes Sec62p exprimiert. Um den Einfluss der C-terminalen Erweiterung mit dem Dha zu testen, wurde auch ein Plasmid verwendet, das das vollständige Sec62p mit dem C-terminal fusionierten Dha exprimiert. Die RSY 529-Transformanden wurden in Flüssigkulturen bei 25°C angezogen und in verschiedenen Verdünnungen auf eine SD-Platte aufgetragen. Diese Platte wurde bei der für RSY 529 semipermissiven Temperatur von 35°C inkubiert (Abb. 3.14).

Die Deletionsmutanten Sec62(C19)Dha, Sec62(C35)Dha und Sec62(N107)Dha komplementieren den temperatursensitiven Phenotyp von RSY 529-Zellen offensichtlich genauso gut wie Sec62p (Abb. 3.14, Reihe 2, 4, 5 und 7). Dabei scheinen die Transformanden mit Sec62(C35)Dha ein geringfügig eingeschränktes Wachstum aufzuweisen (Reihe 5). Dieser Effekt wird deutlicher bei der für RSY 529 restriktiven Wachstumstemperatur von 37°C (nicht gezeigt). Die Deletionsmutanten Sec62(C60)Dha und Sec62(C125)Dha können hingegen den temperatursensitiven Wachstumsdefekt des RSY 529 nicht komplementieren (Reihe 6 und 8).

Bei den Transformanden, die diese Proteine exprimieren, sind ebenso wenige Zellen zu sehen wie bei der Kontrolle mit dem Leerplasmid (Reihe 1). Die C-terminale Erweiterung von Sec62p um das Dha scheint die Funktionalität dieses Proteins in diesem Test nicht zu beeinflussen. Die RSY 529-Zellen mit diesem Fusionsprotein wachsen genauso gut wie die mit unmodifiziertem Sec62p (vergleiche Reihe 1 und 2).

Aus diesem Test gehen die Deletionsmutanten Sec62(C19)Dha, Sec62(C35)Dha und Sec62(N125)Dha als funktionelle Proteine hervor, wobei die Funktionalität des Sec62(C35)Dha etwas eingeschränkt ist. Die Deletionsmutanten Sec62(C60)Dha und Sec62(C125)Dha sind hingegen nicht funktionell. Da in den folgenden Experimenten stets die N_{ub}-Fusionsproteine der Deletionsmutanten des Sec62p eingesetzt wurden, wurden diese ebenfalls auf ihre Funktionalität hin überprüft. Es ergibt sich, dass die N-terminale Erweiterung

um das N_{ub} keine Veränderung des Komplementationsverhaltens der *Sec62p*-Deletionsmutanten in RSY 529 bewirkt (nicht gezeigt).

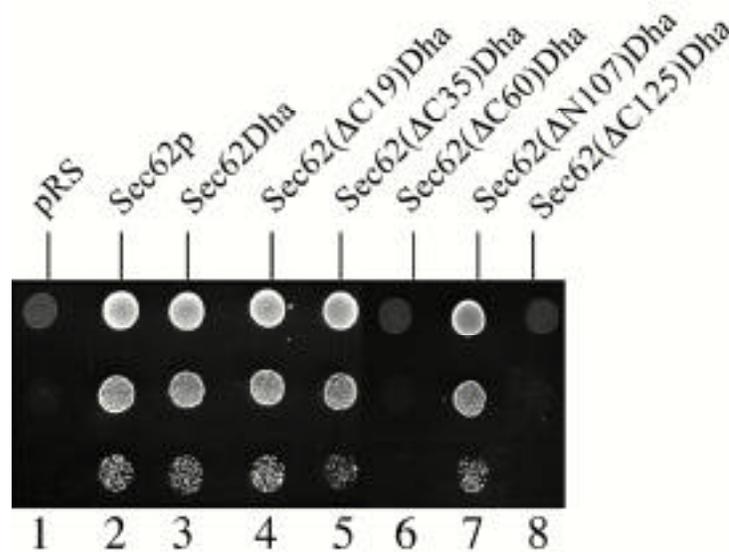


Abb. 3.14 Die Funktionalität der *Sec62p*-Deletionsmutanten. Zellen des Hefestammes RSY 529, die ein temperatursensitives Allel des *SEC62* tragen (*sec62-1*), exprimieren die angegebenen Fusionsproteine. Die Hefezellen wurden in Flüssigkulturen bei 25°C angezogen, in Verdünnungen von 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen auf eine SD-Platte aufgetragen und bei der für diesen Hefestamm semipermissiven Temperatur von 35°C drei Tage lang inkubiert.

3.3.2 Die Interaktion zwischen N_{ub} -*Sec62p*-Deletionsmutanten und C_{ub} -Translokationssubstraten

Im Folgenden wurde die Interaktion der verschiedenen N_{ub} -*Sec62p*-Deletionsmutanten mit dem Translokationssubstrat Mf 1-37 C_{ub} -Dha getestet. Dazu wurden Wildtyp-Hefezellen, die die N_{ub} -Fusionsproteine zusammen mit dem Translokationssubstrat exprimieren, in der Western-Blot-

Analyse untersucht. Die Menge des abgespaltenen Reporterproteins Dha kann wieder als Maß für die Stärke der Interaktion zwischen den jeweils eingesetzten Fusionsproteinen gelten. Als Referenz dient die Reaktion des $N_{ub}Sec62p$ mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha.

Die Intensität des Dha-Signals ist bei der Koexpression von $N_{ub}Sec62p$ und $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha am größten (Abb. 3.15, Spur 1). Schon die C-terminale Erweiterung des $N_{ub}Sec62p$ um das Dha vermindert die Reassoziationsrate der beiden Fusionsproteine (Spur 2). Die Interaktionen der verwendeten $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten müssen also mit der Interaktion des $N_{ub}Sec62p$ -Dha verglichen werden, da sie alle die Dha-Erweiterung tragen.

$N_{ub}Sec62p(C19)$ -Dha scheint ähnlich stark mit dem Translokationssubstrat zu interagieren wie $N_{ub}Sec62p$ -Dha (Spur 2 und 3). Die Nähe von $N_{ub}Sec62p$ -Derivaten zum C_{ub} -Translokationssubstrat nimmt dann bei wachsender C-terminaler Deletion des $Sec62p$ -Fusionsproteins stetig ab. So ergibt die Koexpression von $N_{ub}Sec62p(C35)$ -Dha mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha ein abgeschwächtes Dha-Signal (Spur 4). Dies nimmt noch weiter in den Zellen ab, die $N_{ub}Sec62p(C60)$ -Dha oder gar $N_{ub}Sec62p(C125)$ -Dha mit dem C_{ub} -Translokationssubstrat koexprimieren (Spur 5 und 7). Die N-terminale Deletion am $Sec62p$ scheint hingegen keinen so drastischen Effekt auf die untersuchte Reassoziationsrate zu haben.

$N_{ub}Sec62p(N107)$ -Dha vermag reproduzierbar einen etwas größeren Anteil an Dha aus dem Translokationssubstrat freizusetzen, als $N_{ub}Sec62p(C35)$ -Dha, $N_{ub}Sec62p(C60)$ -Dha und $N_{ub}Sec62p(C125)$ -Dha (vergleiche Spur 4 mit Spur 5 und 7).

Da alle $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten mit Dha erweitert sind, konnten sie zusammen mit dem abgetrennten Dha in der selben Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. $N_{ub}Sec62p$ -Dha, $N_{ub}Sec62p(C19)$ -Dha, $N_{ub}Sec62p(C35)$ -Dha und $N_{ub}Sec62p(C60)$ -Dha werden nahezu gleich stark exprimiert. $N_{ub}Sec62p(N107)$ -Dha und $N_{ub}Sec62p(C125)$ -Dha erscheinen etwas schwächer exprimiert. In einem Interaktionstest mit dem neutralen C_{ub} -Fusionsprotein $Tpi1C_{ub}$ -Dha wie in Kapitel 3.1.2 sind jedoch alle eingesetzten $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten im gleichen Ausmaß in der Lage, die Abspaltung des Dha vom C_{ub} zu induzieren (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha tatsächlich auf die Eigenschaften der $Sec62p$ -Derivate zurückzuführen sind und nicht auf ein unterschiedliches Expressionsniveau oder eine unterschiedliche Reaktivität der N_{ub} -Fusionsproteine mit einem neutralen C_{ub} -Fusionsprotein.

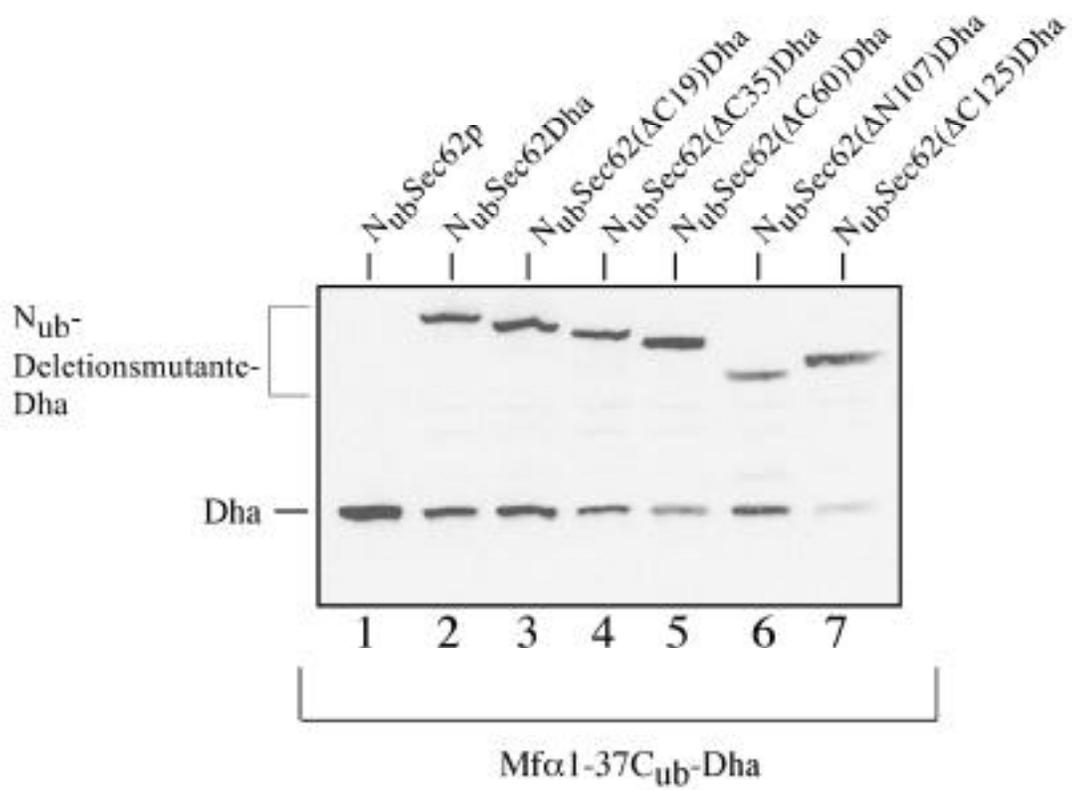


Abb. 3.15 Die Proximität der N_{ub}Sec62-Deletionsmutanten zu Mfα1-37C_{ub}-Dha. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen N_{ub}-Fusionsproteine zusammen mit Mf 1-37C_{ub}-Dha exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

3.3.3 Die Quantifizierung der Interaktion zwischen $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten und $Mf\alpha 1-37C_{ub}$ -Dha

Die Reaktionen zwischen den $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten und dem C_{ub} -Translokationssubstrat im Split-Ub-System sollten nun quantitativ beschrieben werden. Dazu wurden die Zellen, die die verschiedenen $N_{ub}Sec62Dha$ -Deletionsmutanten oder $N_{ub}Sec62p$ gemeinsam mit $Mf 1-37C_{ub}$ -Dha exprimieren, radioaktiv markiert und die Proteine mit dem HA-Epitop mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers präzipitiert. Dadurch kann das Verhältnis von abgespaltenem Dha zu transloziertem $Mf 1-37C_{ub}$ -Dha, das durch die gleichzeitige Expression mit den verschiedenen $N_{ub}Sec62p$ -Deletionsmutanten erzeugt wird, ermittelt werden.

$N_{ub}Sec62p$ zeigt die stärkste Interaktion mit $Mf 1-37C_{ub}$ -Dha (Spur 1). Schon $N_{ub}Sec62Dha$ kann bedeutend weniger Dha freisetzen (Spur 2). Das Signal für Dha bei der Koexpression von $N_{ub}Sec62(C19)Dha$ und dem Translokationssubstrat ist noch schwächer (Spur 3). Bei der Verwendung der anderen C-terminalen $N_{ub}Sec62Dha$ -Deletionsmutanten ($N_{ub}Sec62(C35)Dha$, $N_{ub}Sec62(C60)Dha$ und $N_{ub}Sec62(C125)Dha$) ist die Interaktion mit $Mf 1-37C_{ub}$ -Dha so schwach, dass kaum noch oder gar kein abgespaltenes Dha mehr zu detektieren ist (Spur 4, 5 und 7). Jedoch kann das N-terminal deletierte $N_{ub}Sec62(N107)Dha$ die Proximität zum C_{ub} -Fusionsprotein im Vergleich zu $N_{ub}Sec62Dha$ nur sehr geringfügig mindern (Spur 6). Die Quantifizierung dreier Experimente dieser Art zeigt deutlich, welche $N_{ub}Sec62Dha$ -Deletionsmutanten noch eine Reassoziationsreaktion mit dem C_{ub} des Translokationssubstrates hervorrufen können. $N_{ub}Sec62(C19)Dha$ und $N_{ub}Sec62(N107)Dha$ interagieren noch mit $Mf 1-37C_{ub}$ -Dha. Die anderen $N_{ub}Sec62Dha$ zeigen eine deutlich verminderte Nähe zum C_{ub} -Fusionsprotein. Die Menge an N_{ub} -Fusionsproteinen, die ebenfalls mit dem HA-Epitop versehen sind, ist bei den hier gewählten experimentellen Bedingungen zu gering, um nachgewiesen zu werden. Bei einer längeren radioaktiven Markierung sind sie allerdings auch detektierbar (Daten nicht gezeigt).

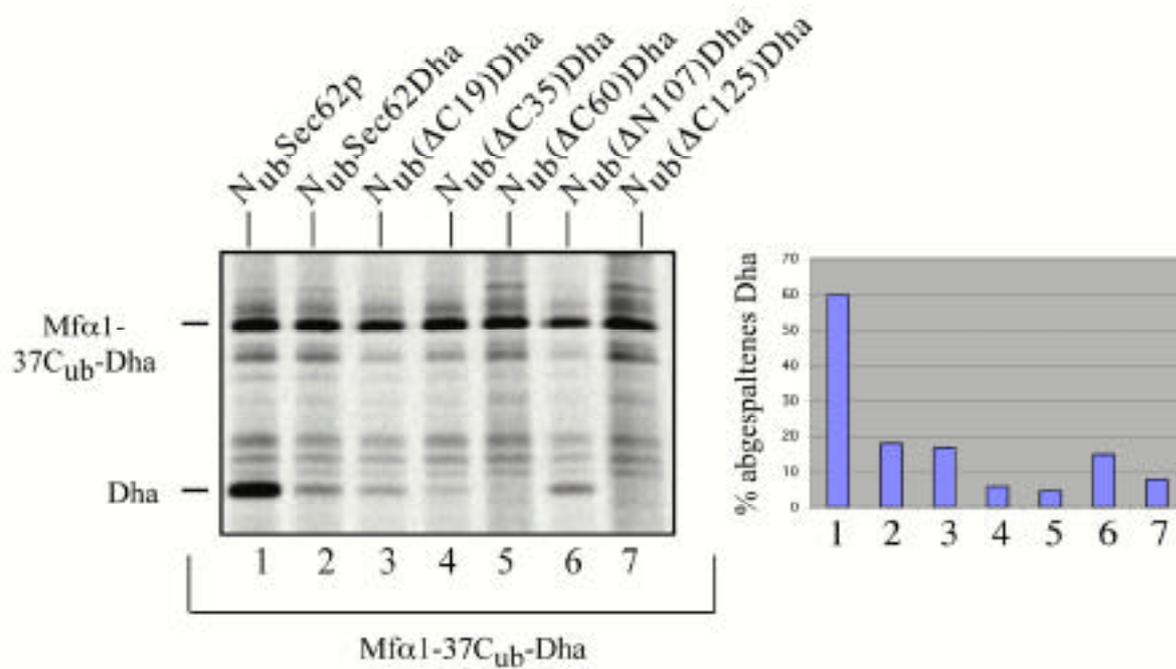


Abb. 3.16 Die Quantifizierung der Nähe der $N_{ub}Sec62$ -Deletionsmutanten zu $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$. **A** Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen N_{ub} -Fusionsproteine zusammen mit $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ exprimieren, wurden mit ^{35}S Methionin für 5 min radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die mit dem HA-Epitop versehenen Fusionsproteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde drei Tage lang exponiert. **B** Die Quantifizierung des Experimentes in **A** erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers. Zur Quantifizierung wurden drei unabhängige Experimente herangezogen. Die Summe aus transloziertem $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ und abgespaltenem Dha wurde als 100 gesetzt. Der abgespaltene Anteil an Dha ist in Prozent angegeben. Der mittlere quadratische Fehler der angegebenen Mittelwerte lag immer unter 5%.

3.3.4 Der Anstau der Carboxypeptidase Y im Zytosol durch Sec62Dha-Deletionsmutanten

Um den Einfluß der Deletionen am Sec62p auf die Translokation in das ER mit einer anderen Methode zu untersuchen, wurde der Transport des Prc1p betrachtet. Hierbei handelt es sich um die Carboxypeptidase Y (CPY), eine vakuoläre Protease der Hefe. Prc1p erfährt auf seinem Weg in die Vakuole verschiedene Modifikationen, die nur in bestimmten Kompartimenten auftreten. Zuerst wird es im Zytosol als Preproprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert (ppCPY). Beim Transport des Prc1p in das ER wird diese Signalsequenz prozessiert. Gleichzeitig wird Prc1p glykosyliert (gCPY). Während der anschließende Reise durch den Golgi-Apparat erfolgen weitere Modifikationen an Zuckerresten am Prc1p. Erreicht das Prc1p die Vakuole, so wird das N-terminale Pro-Segment des Proteins abgespalten (mCPY). Alle diese Modifikationen verändern das Molekulargewicht des Proteins, so dass anhand seines Laufverhaltens in der SDS-PAGE der jeweilige Modifikationszustand des Prc1p und damit sein Aufenthaltsort innerhalb der Zelle abgelesen werden kann. Durch diese Eigenschaften wird Prc1p zu einem Indikator für Störungen des Transportes von Proteinen bei ihrem Weg von der Synthese im Zytosol über das ER und den Golgi-Apparat bis zur Vakuole.

Im Interesse dieser Arbeit stand der erste Transportschritt des Prc1p vom Zytosol in das ER. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Sec62p an der ER-Translokation des Prc1p beteiligt ist. Mit seiner weniger hydrophoben Signalsequenz ist Prc1p nämlich ein Substrat des posttranslationalen Translokationsmechanismus (Ng et al., 1996).

Es wurde nun die Frage gestellt, ob die eingeführten Deletionen am Sec62p eine gestörte Translokation des Prc1p verursachen.

Zu diesem Zweck wurden Hefestämme geschaffen, die die Sec62Dha-Deletionsmutanten als einzige Version des Sec62p exprimieren. Dies kann natürlich nur für die zumindest partiell funktionellen Sec62p-Derivate geschehen. Nach erfolgten Plasmid-Austausch-Experimenten (s. Materialien und Methoden) lagen somit Hefezellen vor, die Sec62p, Sec62(C19)Dha, Sec62(C35)Dha oder Sec62(N107)Dha von einem Plasmid aus exprimieren und keine native Kopie des Sec62p mehr aufweisen. Diese Zellen wurden radioaktiv markiert und Prc1p mit dem Anti-CPY-Antikörper präzipitiert.

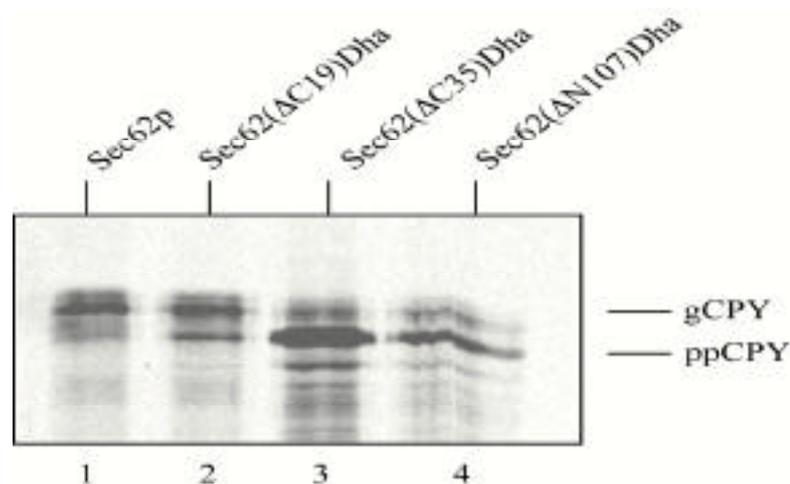


Abb. 3.17 Der Anstau von ppCPY im Zytosol in Zellen, die die Sec62p-Deletionsmutanten als einzige Sec62p-Versionen exprimieren. Hefezellen, die durch einen Plasmidaustausch nur noch die angegebenen Versionen von Sec62p exprimieren, wurden für 10 min mit ^{35}S Methionin radioaktiv markiert, aufgeschlossen und das CPY-Protein mit einem Anti-CPY-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für fünf Tage exponiert. gCPY bezeichnet die in das ER translozierte und dort glykosilierte Form des Prc1p. ppCPY kennzeichnet die im Zytosol angereicherte Prepro-Form des Proteins.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ist als einzige Prc1p-Form das im ER glykosylierte Protein (gCPY) nachzuweisen. Bei der Verwendung der Zellen mit den Sec62Dha-Deletionsmutanten taucht eine zusätzliche Bande auf. Sie repräsentiert die nicht translozierte Form des Prc1p, die noch ihre Signalsequenz trägt und sich wahrscheinlich im Zytosol befindet (ppCPY). Die Menge an ppCPY variiert für die verschiedenen Sec62p-Derivate. Während für Sec62(ΔC19)Dha nur eine geringe Menge an ppCPY nachzuweisen ist (Abb. 3.17, Spur 2), scheint dies die dominierende Prc1p-Form bei den Zellen zu sein, die entweder Sec62(ΔC35)Dha oder Sec62(ΔN107)Dha als einzige Sec62p-Version exprimieren (Spur 3 und 4). In diesen Zellen akkumuliert also ppCPY im Zytosol und wird nicht effizient in das ER transportiert. Aus diesem Experiment kann der Einfluss der C-terminalen Dha-Erweiterung der Sec62p-Deletionsmutanten nicht abgelesen werden, da Zellen, die nur Sec62Dha exprimieren, nicht als Referenz verwendet wurden. Es lässt sich aber feststellen, dass die Deletionen am N- bzw. C-Terminus des Sec62p in den Deletionsmutanten Sec62(ΔN107)Dha und Sec62(ΔC35)Dha die Translokation des Prc1p stören.

3.4 Die Untersuchung der Sec62p-Homologen anderer Spezies

Bei der Suche nach Proteinen, die dem Sec62p homolog sind, konnten im Genom vieler Spezies ORFs gefunden werden, deren translatierte Aminosäuresequenzen eine signifikante Übereinstimmung mit der von Sec62p aus *S. cerevisiae* aufweisen. Dazu zählen Sequenzen aus den Hefen *Yarrowia lipolytica* (Swennen et al., 1997) und *Schizosaccharomyces pombe* (Datenbank DDBJ/GenbankTM/EBI Datenbank Zugangsnummer Z99162). Aber auch im Genom des Menschen (*Homo sapiens*) (Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000), sowie der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*) konnte ein Sec62p-Homolog aufgefunden werden.

Bei dem Vergleich der vier Aminosäuresequenzen sind bei allen die beiden Transmembrandomänen deutlich zu erkennen (Abb. 3.18). Sie weisen eine starke Homologie zueinander auf. Ausgehend von den Transmembrandomänen können die Unterschiede und Gemeinsamkeiten an den N-Termini und den C-Termini der vier Proteine betrachtet werden. Auffallend ist hierbei die verschiedene Länge der Termini. Während die Länge der Aminosäuresequenzen aus *S. cerevisiae* und *S.pombe* ausgehend von den Transmembrandomänen nahezu übereinstimmt, erweisen sich die N- und C-terminalen Abschnitte aus *Y. lipolytica* und *H. sapiens* als wesentlich ausgedehnter. Abgesehen vom Längenunterschied, zeigen sich in diesen Teil-Abschnitten dieser Sequenzen einige Übereinstimmungen. Dazu zählt der hohe Anteil an positiv geladenen Aminosäuren am N-Terminus aller vier Proteine. Auch am C-Terminus kann eine solche Anhäufung positiver Ladungen erkannt werden. Am auffälligsten ist aber der hochkonservierte Aminosäureabschnitt, der C-terminal der zweiten Transmembrandomäne folgt. Dieser Teil von etwa 40 Aminosäureresten Länge weist an einigen Stellen sogar eine identische Abfolge der Aminosäuren in allen vier Proteinen auf.

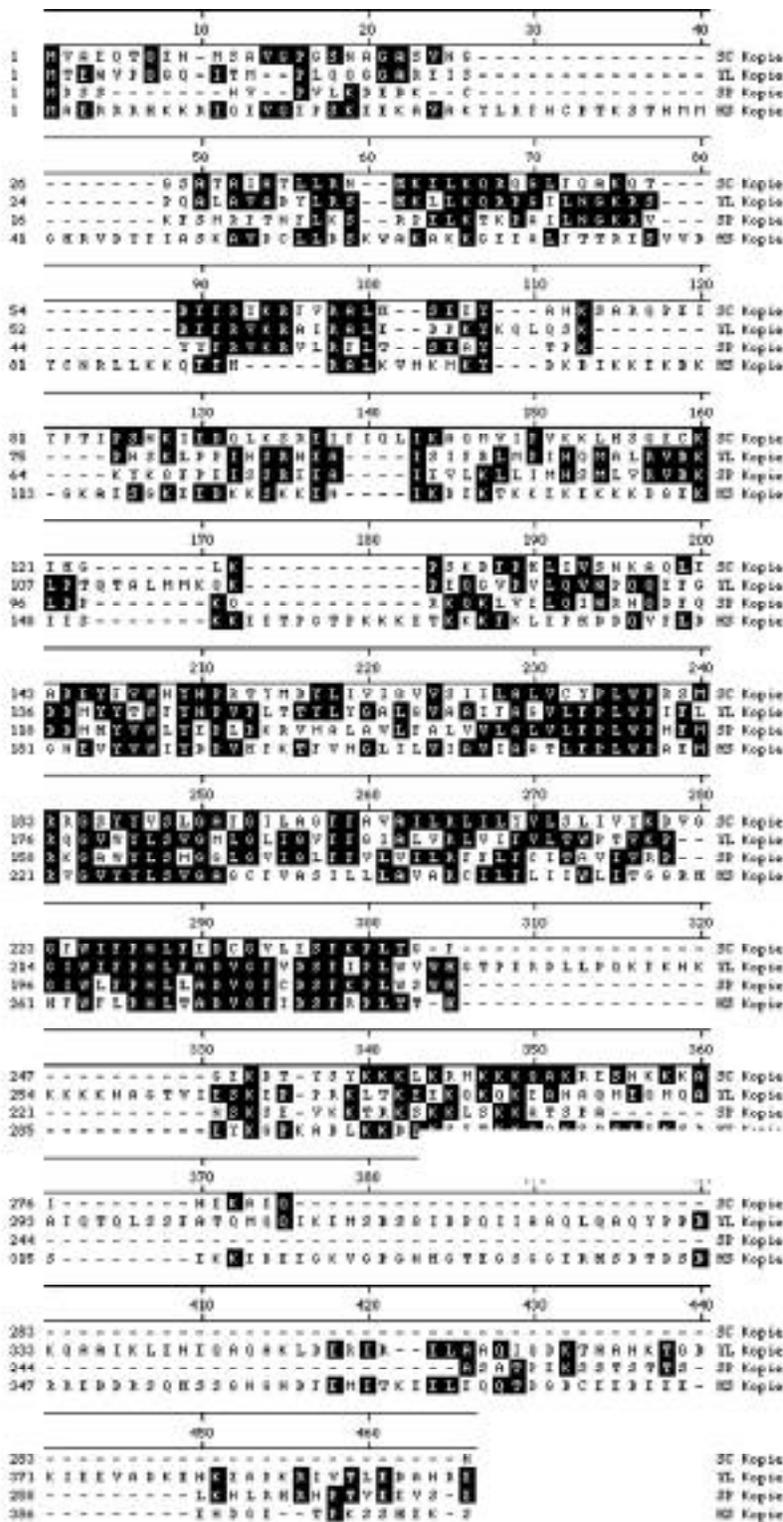


Abb.3.18 Der Vergleich der Sec62p-Aminosäuresequenzen aus vier verschiedenen Spezies. Die Aminosäuresequenzen des Sec62p aus *S. cerevisiae* (Sc), *Y. lipolytica* (Yl), *S. pombe* (Sp) und *H. sapiens* (Hs) wurden mit Hilfe des Computerprogrammes MegAlign verglichen. Schwarz unterlegt sind identische Aminosäuren in den Sequenzen.

Untersucht wurde nun, welche Funktionen des Sec62p innerhalb der verschiedenen Spezies konserviert sind. Die Unterschiede der Proteine in Bezug auf ihre Funktionalität in *S. cerevisiae* und auf ihre Interaktion mit Translokationssubstraten standen dabei im Vordergrund.

3.4.1 Funktionalität der Sec62p-Homologen in *S. cerevisiae*

Es wurde getestet, ob die Sec62p-Homologen der drei betrachteten Spezies das native Sec62p in *S. cerevisiae* ersetzen können. Dazu wurde erneut ein Plasmid-Austausch-Experiment durchgeführt. Abb. 3.19 zeigt, dass Zellen von *S. cerevisiae*, die Sec62p aus *Y. lipolytica* und *S. pombe* als einzige Sec62p-Versionen exprimieren, lebensfähig sind (Swennen et al., 1997). Das Sec62p aus *H. sapiens* hingegen konnte als einzige Sec62p-Variante den *S. cerevisiae*-Zellen nicht zum Wachstum verhelfen. Zellen mit dem Leerplasmid und Zellen, die nur Sec62(ΔC60)Dha exprimieren, dienten als Negativ-Kontrollen.

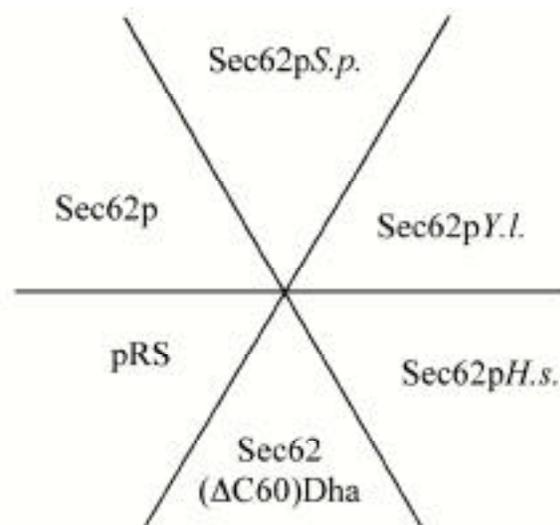
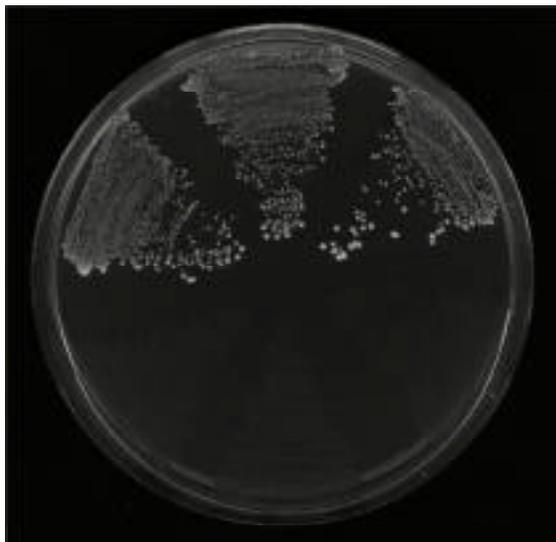


Abb. 3.19 Die Funktionalität der Sec62p-Homologen anderer Spezies. In einem Plasmid-Austausch-Experiment wurden Hefestämme hergestellt, die neben den angegebenen Versionen des Sec62p noch zusätzlich das Sec62p aus *S. cerevisiae* von einem Plasmid exprimieren. Diese Zellen wurden auf FOA-Platten aufgetragen und nach einer dreitägigen Inkubation bei 30°C dokumentiert. Nur die Zellen können auf FOA-Platten wachsen, die das Plasmid, mit dem SEC62-Gen aus *S. cerevisiae* verlieren können.

Da in einem weiteren Experiment die N_{ub}-Versionen der Sec62p aus allen Spezies verwendet wurden, wurden auch diese Fusionsproteine auf ihre Funktionalität hin getestet. Wieder verursacht die N-terminale Fusion des N_{ub} keine Veränderung in Bezug auf die Funktionalität der getesteten Proteine (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Die Interaktion der N_{ub}Sec62p aus verschiedenen Spezies mit Mf α 1-37C_{ub}-Dha

N_{ub}Sec62p von *Y. lipolytica*, *S. pombe* und *H. sapiens* wurden mit dem Translokationssubstrat Mf 1-37C_{ub}-Dha in Wildtyp-Hefezellen (*S.cerevisiae*) exprimiert. Als Referenz dient die Interaktion des N_{ub}Sec62p aus *S. cerevisiae* mit Mf 1-37C_{ub}-Dha, als Negativ-Kontrolle wurde N_{ub}Bos1p verwendet.

Der Western-Blot zeigt, dass die N_{ub}-Sec62p aus den anderen Spezies bestenfalls sehr geringe Mengen des Dha aus dem Mf 1-37C_{ub}-Dha freisetzen können. Die Menge an abgespaltenem Dha bei der Koexpression von N_{ub}Sec62p *S.p.* mit dem Translokationssubstrat liegt nur etwas über der unspezifischen Reaktion, die N_{ub}Bos1p und Mf 1-37C_{ub}-Dha miteinander eingehen (Abb. 3.20, Spuren 3 und 5). Nur bei langer Exposition des Blots, wie in Abb. 3.20 gezeigt, kann bei Verwendung von N_{ub}Sec62 $Y.l.$ überhaupt ein Dha-Signal nachgewiesen werden (Spur2), während die gleichzeitige Expression des humanen N_{ub}Sec62p und Mf 1-37C_{ub}-Dha kein Signal ergibt (Spur 4).

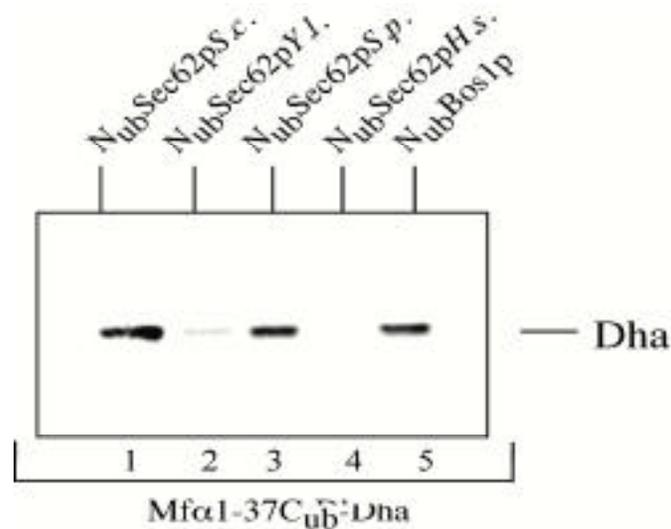


Abb. 3.20 Die Proximität der $N_{ub}Sec62p$ -Fusionsproteine verschiedener Spezies zu $Mf\alpha1-37C_{ub}$ -Dha. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des Dha-Reporters im Western-Blot erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*, *Y.l.* = *Yarrowia lipolytica*, *S.p.* = *Schizosaccharomyces pombe*, *H.s.* = *Homo sapiens*.

Um sicherzustellen, dass diese Unterschiede in der Reassoziaton von N_{ub} und C_{ub} im eben geschilderten Experiment nicht auf ein unterschiedliches Expressionsverhalten der N_{ub} -Fusionsproteine zurückzuführen sind, wurde wie schon zuvor das neutrale C_{ub} -Konstrukt $Tpi1C_{ub}$ -Dha eingesetzt. Bei der gleichzeitigen Expression von $Tpi1C_{ub}$ -Dha mit den $N_{ub}Sec62p$ der vier verschiedenen Spezies wurde bei allen vier N_{ub} -Fusionsproteinen nahezu die gleiche Menge an Dha abgespalten (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass alle vier $N_{ub}Sec62p$ in etwa gleicher Weise exprimiert werden und ihre N_{ub} -Anhänge gleich stark mit einem neutralen C_{ub} reassoziieren können.

Es zeigt sich also, dass die $N_{ub}Sec62$ -Fusionsproteine der anderen Spezies nicht spezifisch mit $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha interagieren können.

3.5 Die hochkonservierte Domäne des Sec62p C-terminal der zweiten Transmembrandomäne

Beim Vergleich der Sec62p der verschiedenen Spezies wurde bereits die hochkonservierte Domäne, die sich C-terminal der zweiten Transmembrandomäne befindet, angesprochen. Durch Mutationen konservierter Aminosäuren sollte die Funktion dieses Abschnittes geklärt werden. Die Deletionsanalyse weist auf einen Bereich im Molekül hin, der für die Funktion des Sec62p essentiell ist. Dieser Bereich scheint die beiden Transmembrandomänen und die darauf folgende zytosolische Domäne bis hin zur Aminosäure an Position 248 des Sec62p zu umfassen. Durch Mutationen konservierter Aminosäuren sollte die Funktion dieses Abschnittes weiter geklärt und durch noch extremere Deletionsmutanten weiter eingegrenzt werden.

3.5.1 Die Sec62p-Mutanten mit einem Austausch an Aminosäureposition 207

Gleich anschließend an die zweite Transmembrandomäne befindet sich bei allen bisher analysierten Sec62p verschiedener Spezies die Aminosäure Arginin (Position 207 in *S. cerevisiae*). Ist eine Aminosäure so stark konserviert, sollte sie auch eine wichtige Funktion im Protein ausüben.

Mit PCR-gestützter Mutagenese wurde der ORF des *SEC62* so verändert, dass an die Stelle des Arginin entweder ein Lysin (Sec62(R207K)p) oder ein Glutamin (Sec62(R207Q)p) tritt. Bei dem Austausch von Lysin gegen Arginin bestand die Absicht, eine sehr geringfügige Veränderung unter Beibehaltung der positiven Ladung der Aminosäure an dieser Position zu erreichen. Bei der zweiten Mutation wird das positiv geladene Arginin gegen das hydrophile Glutamin ausgetauscht.

3.5.1.1 Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q)p sind funktionell

Die Funktionalität der Sec62p-Derivate wird in einem Plasmid-Austausch-Experiment überprüft. Dieses hat zur Folge, dass die Zellen Sec62(R207K)p oder Sec62(R207Q)p als einzige Versionen des Sec62p exprimieren. Als Referenz dienten Zellen mit unmodifiziertem Sec62p.

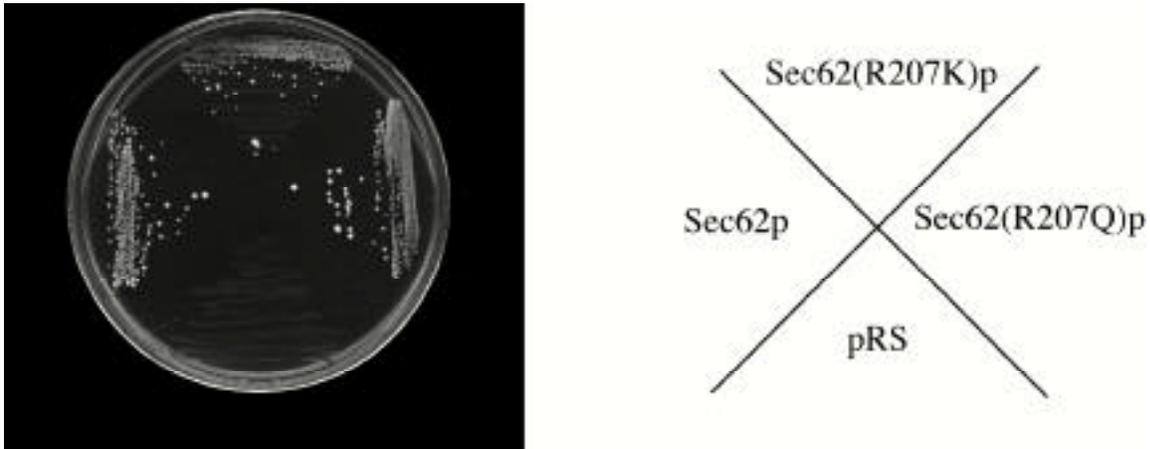


Abb. 3.21 Die Funktionalität der *SEC62*-Mutanten mit einem Aminosäureaustausch an Position 207. Hefezellen, die neben den angegebenen Punktmutanten des Sec62p oder unmodifiziertes Sec62p noch zusätzlich das FLAG-Sec62p von einem Plasmid exprimieren, wurden auf eine FOA-Platte aufgetragen und nach einer dreitägigen Inkubation bei 30°C dokumentiert. Nur die Zellen wachsen auf FOA-Platten, die das Plasmid, von dem FLAG-Sec62p exprimiert wird, verlieren können.

Nach dem Plasmid-Austausch-Experiment wachsen auf FOA-Platten etwa gleich viele Kolonien vergleichbarer Größe in den Zellen, die Sec62p, Sec62(R207K)p oder Sec62(R207Q)p von Plasmiden exprimieren. Die Sec62p-Mutanten scheinen also funktionell zu sein (Abb. 3.21). Das selbe Ergebnis wurde auch bei der Verwendung der N_{ub}-Versionen dieser Proteine erzielt (nicht gezeigt).

Die für den Funktionalitätstest verwendeten Zelle wurden in der Western-Blot-Analyse auf die Expression der verwendeten Sec62p-Versionen getestet. Zum immunologischen Nachweis wurde der Anti-Sec62p-Antikörper eingesetzt. Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q)p werden demnach nur geringfügig schlechter exprimiert oder sind etwas instabiler als Sec62p (Abb. 3.22).

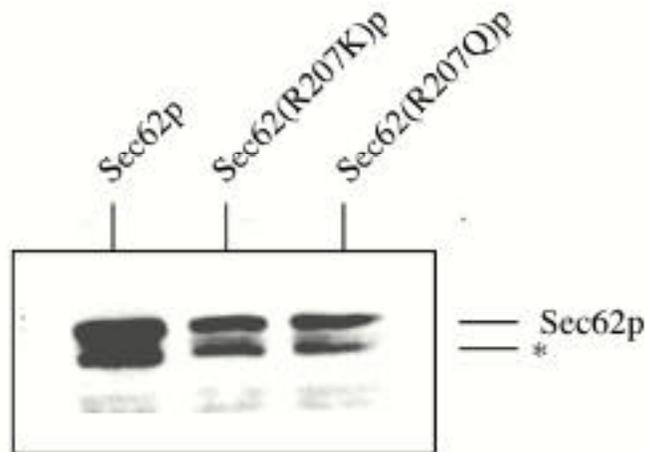


Abb. 3.22 Die Expression von Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q)p. Hefezellen, die nach einem Plasmid-Austausch-Experiment die angegebenen Sec62p-Versionen als einziges Sec62p exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis von Sec62p und Sec62(R207K)p bzw. Sec62(R207Q)p erfolgte mit Hilfe des Anti-Sec62p-Antikörpers. Mit * ist eine Bande bezeichnet, die wahrscheinlich durch eine Translationsinitiation am ATG in Position 10 des ORF von SEC62 entsteht.

3.5.1.2 Die Interaktion zwischen $N_{ub}Sec62(R207K)p$ oder $N_{ub}Sec62(R207Q)p$ und $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$

Wildtyp-Hefezellen, die $N_{ub}Sec62p$, $N_{ub}Sec62(R207K)p$ oder $N_{ub}Sec62(R207Q)p$ zusammen mit $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ exprimieren, wurden benutzt, um in der Western-Blot-Analyse die Interaktion der N_{ub} - und C_{ub} -Fusionsproteine zu untersuchen. Als Negativkontrolle dienten erneut Zellen, die $N_{ub}Bos1p$ mit $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ exprimieren.

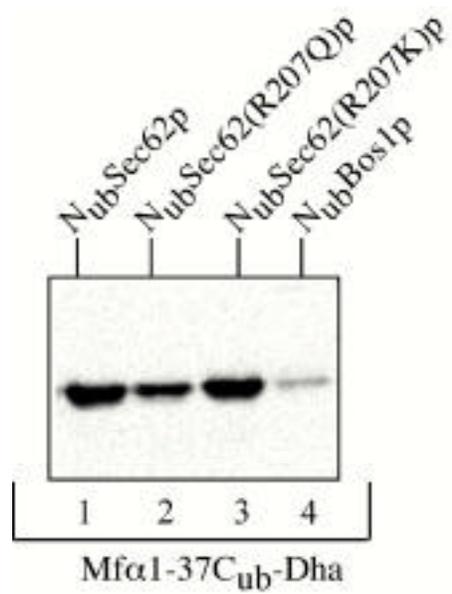


Abb. 3.23 Die Proximität der Sec62p-Mutanten $N_{ub}Sec62(R207K)p$ und $N_{ub}Sec62(R207Q)p$ zu $Mf\alpha1-37C_{ub}-Dha$. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der Proteine im Western-Blot erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

Beide $N_{ub}Sec62p$ -Mutanten interagieren mit $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$. $N_{ub}Sec62(R207K)p$ induziert etwa die gleiche Menge an abgespaltenem Dha wie $N_{ub}Sec62p$ (Abb. 3.23, Spur 1 und 3). $N_{ub}Sec62(R207Q)p$ induziert in geringerem Maße die Abspaltung des Dha (Spur 2). Das Signal bei beiden $N_{ub}-Sec62p$ -Mutanten ist aber wesentlich stärker als das Signal, das durch die Koexpression von $N_{ub}Bos1p$ und $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ (Spur 4) entsteht.

3.5.1.3 Der Anstau von ppCPY im Zytosol durch die Punktmutanten $Sec62(R207K)p$ und $Sec62(R207Q)p$

Die auch für den Funktionalitätstest verwendeten Hefezellen, die nur die an Aminosäureposition 207 mutierten $Sec62p$ -Versionen exprimieren, wurden für die Untersuchung der $Prc1p$ -Translokation verwendet. Als Referenz dienten zum einen Wildtyp-Hefezellen, zum anderen Zellen, die eine Deletion des $SEC72$ -Gens tragen.

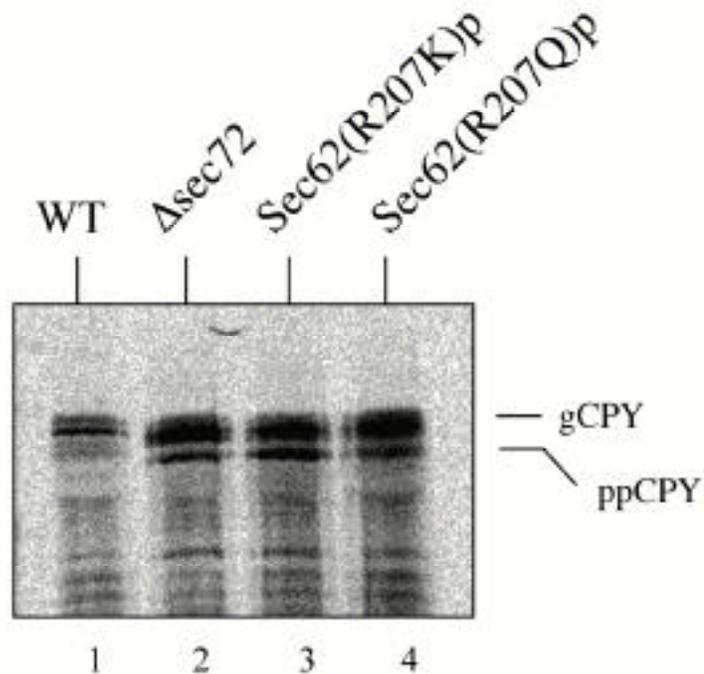


Abb. 3.24 Die Punktmutanten Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q) erlauben nur eine gestörte Translokation des Prc1p. Wildtyp-Hefezellen (WT), Zellen mit einer Deletion des *SEC72* (*sec72*) und Zellen, die nach einem Plasmidtausch die angegebenen Mutanten von Sec62p als einzige Versionen dieses Proteins exprimieren (Sec62(R207K)p bzw. Sec62(R207Q)p), wurden für 10 min mit ^{35}S Methionin radioaktiv markiert, aufgeschlossen und Prc1p mit einem Anti-CPY-Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel für vier Tage exponiert. gCPY bezeichnet die im ER glykosylierte Form des CPY, während ppCPY die Prepro-Form des Proteins beschreibt.

Hefezellen, denen Sec72p fehlt, weisen einen geringfügigen Translokationsdefekt von Prc1p auf. Die Prepro-Form des Prc1p (ppCPY) ist nur dort detektierbar, wo entweder Sec72p fehlt oder Sec62(R207K)p oder Sec62(R207Q)p die einzigen Sec62p-Versionen in den Zellen sind (Abb. 3.24, Spur 2 ,3 und 4). In Wildtyp-Hefezellen ist lediglich die glykosylierte Form des Prc1p

(gpCPY) nachzuweisen (Spur 1). Das bedeutet, dass Sec62(R207K)p und Sec62(R207Q)p nicht vollständig funktionelle Proteine sind. Der Transport des Prc1p in das ER ist durch diese Mutationen beeinträchtigt.

3.5.1.4 Die Interaktion zwischen Sec62(R207Q)p und Sec63p im Split-Ub-System

Um zu testen, ob die Mutante Sec62(R207Q)p noch mit Sec63p, einem Protein des tetrameren Sec-Komplexes, interagieren kann, wurde eine andere Variante des Split-Ub-Systems eingesetzt. Mit Hilfe des Split-Ub-Systems kann die Interaktion zweier Membranproteine untersucht werden (Stagljar *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 2000). Dazu wird das eine Membranprotein N-terminal mit dem N_{ub} verlängert, das andere Membranprotein C-terminal mit dem C_{ub} und einem Reporterprotein. N_{ub} und C_{ub} müssen dabei beide auf der zytosolischen Seite der Membran sein. Treten die beiden Membranproteine in Kontakt, so können N_{ub} und C_{ub} reassoziieren und der Reporter wird von den Ubps freigesetzt. In dem folgenden Experiment wurde RUr3p als Reportsystem verwendet, das sich C-terminal vom C_{ub} befindet (Abb. 3.25). Fusionsproteine, die C_{ub}-RUr3p an ihren C-Termini tragen, können Hefezellen Uracil-Prototrophie vermitteln. Das bedeutet, dass die Expression von C_{ub}-RUr3p-Fusionsproteinen Zellen auf Uracil-freiem Medium wachsen läßt. Wird nun ein solches C_{ub}-RUr3p-Fusionsprotein gemeinsam mit einem N_{ub}-Fusionsprotein exprimiert, so können zwei verschiedene Szenarien auftreten. Interagieren die beiden Fusionsproteine nicht miteinander, verbleibt genügend ungeschnittenes C_{ub}-RUr3p-Fusionsprotein und die Zellen können weiterhin auf Uracil-freiem Medium wachsen. Interagieren die Fusionsproteine jedoch miteinander, so reassoziieren N_{ub} und C_{ub} effizient zum vollständigen Ubiquitin und die Ubps setzen RUr3p im Zytosol frei (Abb. 3.25). Das N-terminale Arginin am Ur3p führt nun gemäß der "N-end-rule" zum raschen Abbau des Ur3p (Bachmair *et al.*, 1986). Als Konsequenz können die Hefezellen nicht mehr auf Uracil-freiem Medium wachsen.

Verglichen wurde nun die Interaktion zwischen der Mutante Sec62(R207Q)p und Sec63p mit der Interaktion des unmodifizierten Sec62p und Sec63p. Wie schon gezeigt (Wittke *et al.*, 1999) kann die enge Nachbarschaft von Sec62p und Sec63p mit dem Split-Ub-System nachgewiesen werden

(Abb. 3.25). In diesem Test wurden auch die N_{ua} - und N_{ug} -Fusionsproteine des N_{ub} eingesetzt, die an Sec62p oder Sec62(R207Q)p fusioniert sind.

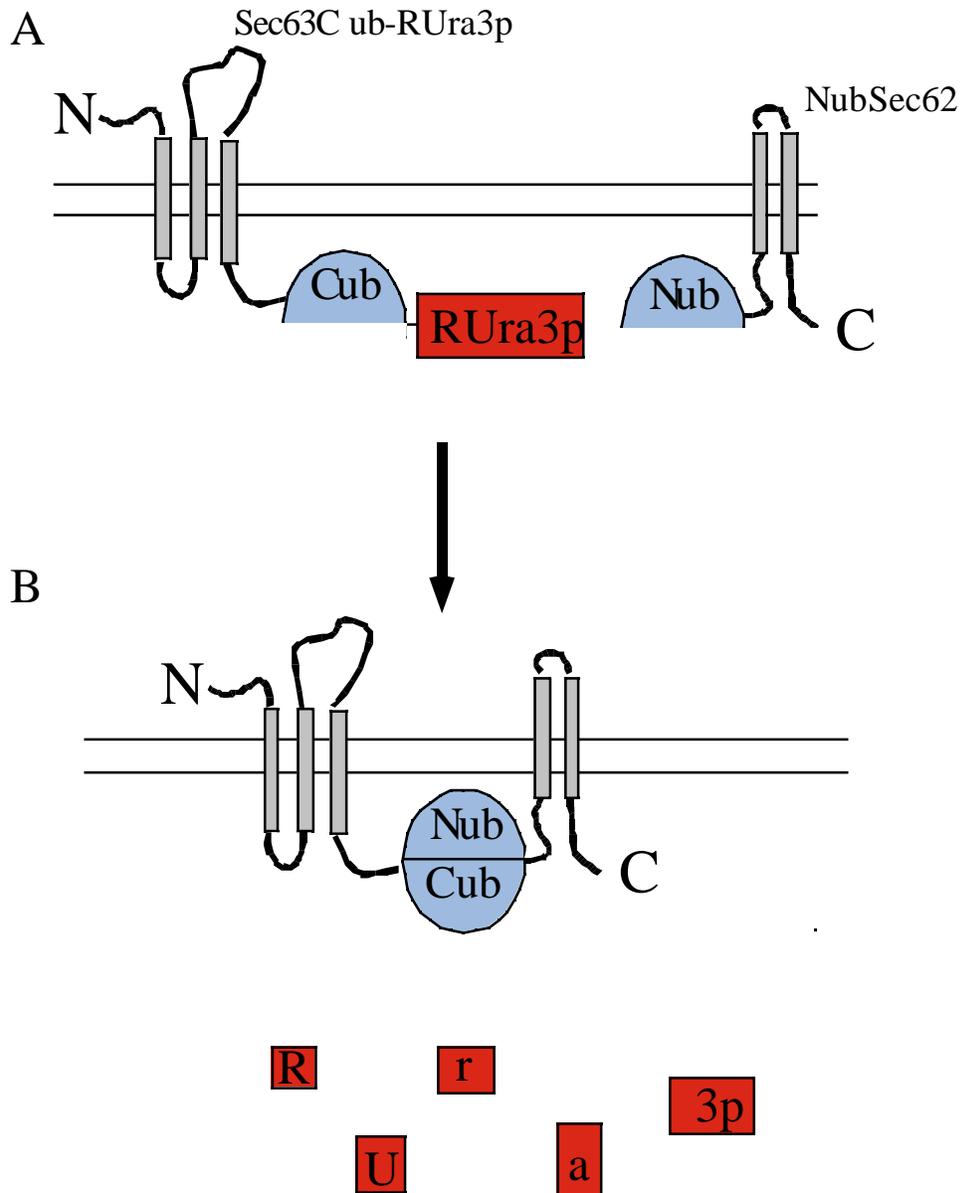


Abb. 3.25 Die Interaktion von Sec62p und Sec63p gemessen mit dem Split-Ub-System. A Das mit dem N_{ub} fusionierte Sec62p wird gemeinsam mit dem Sec63C_{ub}-RUra3p in Wildtyp-Hefezellen exprimiert. **B** N_{ub} Sec62p und

Sec63C_{ub}-RUra3p kommen sich so nahe, dass N_{ub} und C_{ub} reassoziieren und RUra3p von den Ubps abgespalten wird. RUra3p wird dann sofort abgebaut.

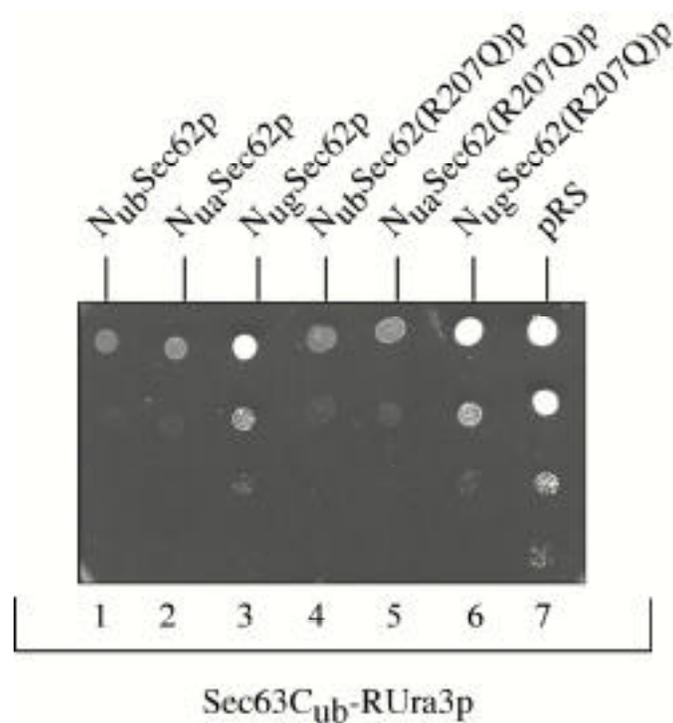


Abb. 3.26 Die Proximität des N_{ub}-, N_{ua}- und N_{ug}Sec62(R207Q)p zu Sec63C_{ub}-RUra3p. Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, wurden in Flüssigkulturen angezogen und auf SD-Platten, die kein Uracil enthalten, in Verdünnungen von 10⁶, 10⁵, 10³ und 10² Zellen aufgetragen. Die Dokumentation der Platte erfolgte nach einer viertägigen Inkubation bei 30°C.

Bei der Koexpression von N_{ub}Sec62p und N_{ua}Sec62p mit Sec63C_{ub}-RUra3p scheint die Reassoziations von N_{ub} bzw. N_{ua} mit C_{ub} so stark zu sein, dass RUra3p vollständig oder zu einem sehr großen Teil abgespalten und abgebaut wird (Abb. 3.26, Reihe 1 und 2). Die betreffenden Zellen können nicht auf Uracil-freiem Medium wachsen. N_{ug}Sec62p hingegen führt nicht zu einer so starken Reaktion mit Sec63C_{ub}-RUra3p (Reihe 3). Dadurch verbleibt ein Teil des RUra3p am Sec63C_{ub} fusioniert und die Zellen können auf Uracil-freiem Medium wachsen. Jedoch ist dieses Wachstum verglichen mit dem Wachstum der Zellen, die Sec63C_{ub}RUra3p ohne ein N_{ub}-Fusionsprotein exprimieren (Reihe 7) eingeschränkt. Die Beschreibung des Interaktionsverhaltens zwischen unmodifiziertem Sec62p und Sec63p trifft auch auf die Mutante

Sec62(R207Q)p zu (Reihe 4, 5 und 6). In diesem Experiment ist kein Unterschied zwischen nativem und mutiertem Sec62p nachzuweisen. Beide Proteine scheinen gleich gut mit Sec63p interagieren zu können.

3.5.2 Die weiteren Punktmutanten des Sec62p

Neben Austauschen der konservierten Aminosäure Arginin an Position 207 des Sec62p wurden noch weitere Mutationen im Sec62p eingeführt. Hierdurch sollte die Funktion des ebenfalls stark konservierten Abschnittes, der von Aminosäureposition 227 bis Position 233 reicht, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden fünf Einzelaustausche, ein Doppelaustausch und ein Dreifachaustausch an Aminosäuren in diesem Teil des Sec62p eingeführt. Alle Aminosäuren wurden dabei in Alanin umgewandelt. Die Mutanten sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt.

Sec62 I p	Sec62(F227A)p
Sec62 II p	Sec62(P228A)p
Sec62 III p	Sec62(N229A)p
Sec62 IV p	Sec62(L230A)p
Sec62 V p	Sec62(D233A)p
Sec62 VI p	Sec62(P228A, D233A)p
Sec62 VII p	Sec62(F227A, N229A, L230A)p

Tab. 3.1 Die Sec62p-Punktmutanten im Bereich der Aminosäuren an Position 227 bis 233. Angegeben sind die im weiteren verwendeten Namen der Mutanten und die genauen Positionen der Einzelaustausche (I-V) bzw. Mehrfachaustausche (VI und VII).

3.5.2.1 Die Funktionalität der weiteren Punktmutanten des Sec62p

In einem Plasmid-Austausch-Experiment wurde getestet, ob die Hefezellen, die Sec62 I-VII p als einzige Sec62p-Versionen exprimieren, wachsen können. Wie in Abb. 3.27 deutlich wird, wachsen nur die Zellen, die die Sec62p-Mutanten Sec62 I p und Sec62 III p exprimieren. Alle anderen Mutanten vermitteln kein Wachstum.

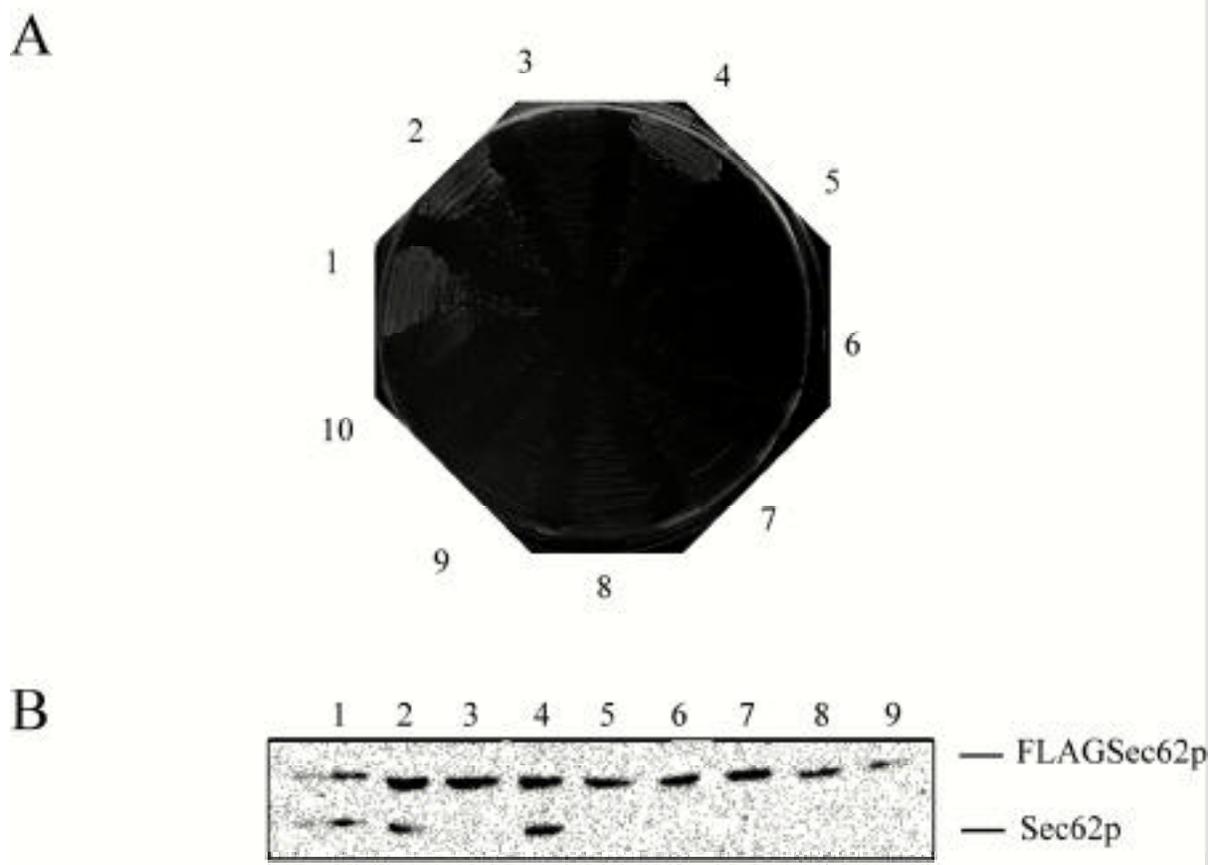


Abb. 3.27 Die Funktionalität und Expression der Sec62p-Mutanten mit einem, zwei oder drei Aminosäureaustauschen in der hochkonservierten Domäne. A Verwendet wurden Hefestämme, die neben den angegebenen Versionen des Sec62p noch zusätzlich das FLAG-Sec62p von einem Plasmid exprimieren. Diese

Zellen wurden auf FOA-Platten aufgetragen und nach einer dreitägigen Inkubation bei 30°C inkubiert. In Sektor 1 befindet sich die Wildtyp-Kopie des Sec62p, in Sektor 2 die Mutante I, in Sektor 3 die Mutante II, in Sektor 4 die Mutante III, in Sektor 5 die Mutante IV, in Sektor 6 die Mutante V, in Sektor 7 die Mutante VI, in Sektor 8 die Mutante VII, in Sektor 9 die Deletionsmutante Sec62(C60)Dha und in Sektor 10 das Leerplasmid. **B** Die gleichen Hefezellen wie in **A** wurden vor dem Plasmidaustausch aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis des FLAG-Sec62-Fusionsproteins sowie der Sec62p-Mutante erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-Sec62p-Antikörpers.

3.5.2.2 Die Expression der Sec62p-Mutanten

Der Nachweis der Expression der Sec62p-Mutanten erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Es wurden die Zellen des Hefe-Stammes 62-F62, die mit den angegebenen Sec62p-Mutanten transformiert wurden, verwendet. Dazu wurde der Anti-Sec62p-Antikörper verwendet. Nur die Sec62p-Mutanten I und III konnten nachgewiesen werden, während alle anderen Mutanten kein Signal ergaben (Abb. 3.27 **B**). Sie scheinen also nicht stabil zu sein und eignen sich damit nicht zur weiteren Untersuchung. Aus diesem Grund stellen sie auch keine funktionellen Versionen des Sec62p dar. Im weiteren werden nur noch Sec62 I p und Sec62 III verwendet. Diese Mutanten werden ähnlich gut exprimiert wie das unmodifizierte Protein.

In dieser Analyse wurden Zellen verwendet, die FLAG-Sec62p exprimieren (s. Genotyp des Hefestammes 62-F62 unter Material und Methoden). Auch dieses Fusionsprotein ist mit dem Anti-Sec62p-Antikörper nachzuweisen.

3.5.2.3 Die Interaktion zwischen N_{ub}Sec62 I p oder N_{ub}Sec62 III p und Mf α 1-37C_{ub}-Dha

Der mit der Mutationsanalyse untersuchte Abschnitt des Sec62p ist möglicherweise an der Erkennung der Signalsequenz beteiligt. Um dies zu klären, wurden N_{ub}-Fusionsproteine von Sec62 I p und Sec62 III p gemeinsam mit dem Translokationssubstrat Mf 1-37C_{ub}-Dha in Wildtyp-Hefezellen exprimiert.

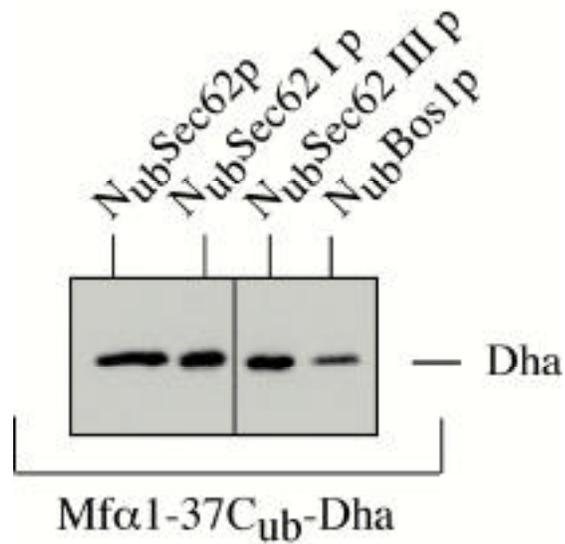


Abb. 3.28 Die Interaktion von NubSec62 I p und NubSec62 III p mit Mf α 1-37C_{ub}-Dha. Die angegebenen Fusionsproteine wurden in Wildtyp-Hefezellen exprimiert, die Zellen aufgeschlossen und die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der mit HA versehenen Fusionsproteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

In der Western-Blot-Analyse ist zu erkennen, dass NubSec62 I p und NubSec62 III p in ungefähr gleichem Maße wie Wildtyp-NubSec62p mit Mf α 1-37C_{ub}-Dha interagieren (Abb. 3.28). Die Nähe von Sec62p zum Translokationssubstrat ist also nicht stark von den eingeführten Mutationen (Sec62(F227A)p und Sec62(P228A)p) beeinträchtigt.

3.5.3 Die Deletionsmutanten Sec62(Δ N206)p und Sec62(Δ N218)p

Um die Rolle des C-terminalen Teils des Sec62p weiter zu erforschen, wurden zwei Deletionsmutanten des Proteins konstruiert, die aus verschiedenen langen Abschnitten C-terminal der zweiten Transmembrandomäne bestehen. Diese Teile des Sec62p lagen als Fusionsproteine Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha bzw. N_{ub} Sec62(N206)Dha und N_{ub} Sec62(N218)Dha vor. Die Interaktion dieser Fusionsproteine mit dem Translokationssubstrat und mit den anderen Proteinen des Sec-Komplexes waren der Gegenstand der folgenden Experimente.

3.5.3.1 Die Funktionalität von Sec62(Δ N206) C_{ub} -Dha, Sec62(Δ N218) C_{ub} -Dha, N_{ub} Sec62(Δ N206)Dha und N_{ub} Sec62(Δ N218)Dha

Durch ein Plasmid-Austausch-Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob die Fusionsproteine Sec62(N206) C_{ub} -Dha, Sec62(N218) C_{ub} -Dha, N_{ub} Sec62(N206)Dha und N_{ub} Sec62(N218)Dha funktionell sind. Erstaunlicherweise können Hefezellen, die Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha als einzige Versionen des Sec62p exprimieren, wachsen. Solche Hefezellen allerdings, die nur N_{ub} Sec62(N206)Dha und N_{ub} Sec62(N218)Dha exprimieren, können nicht wachsen (Abb. 3.29 A). Der bei den hier eingesetzten Fusionsproteinen vorliegende C-terminale Teil des Sec62p kann somit zumindest unter bestimmten Umständen die essentiellen Funktionen des Proteins übernehmen. Da dieses Ergebnis sehr unerwartet war, wurde es mit Hilfe des Hefestammes RSY 529 überprüft. RSY 529-Zellen, die entweder Sec62p, Sec62(N206) C_{ub} -Dha oder Sec62(N218) C_{ub} -Dha exprimieren, wurden zusammen mit RSY 529-Zellen, die nur ein Leerplasmid enthalten, auf Platten aufgetragen und bei der semipermissiven Temperatur von 35°C inkubiert. Es zeigt sich erneut, dass beide N-terminal deletierten Fusionsproteine den temperatursensitiven Wachstumsdefekt des RSY 529 komplementieren können (Abb. 3.29 B).

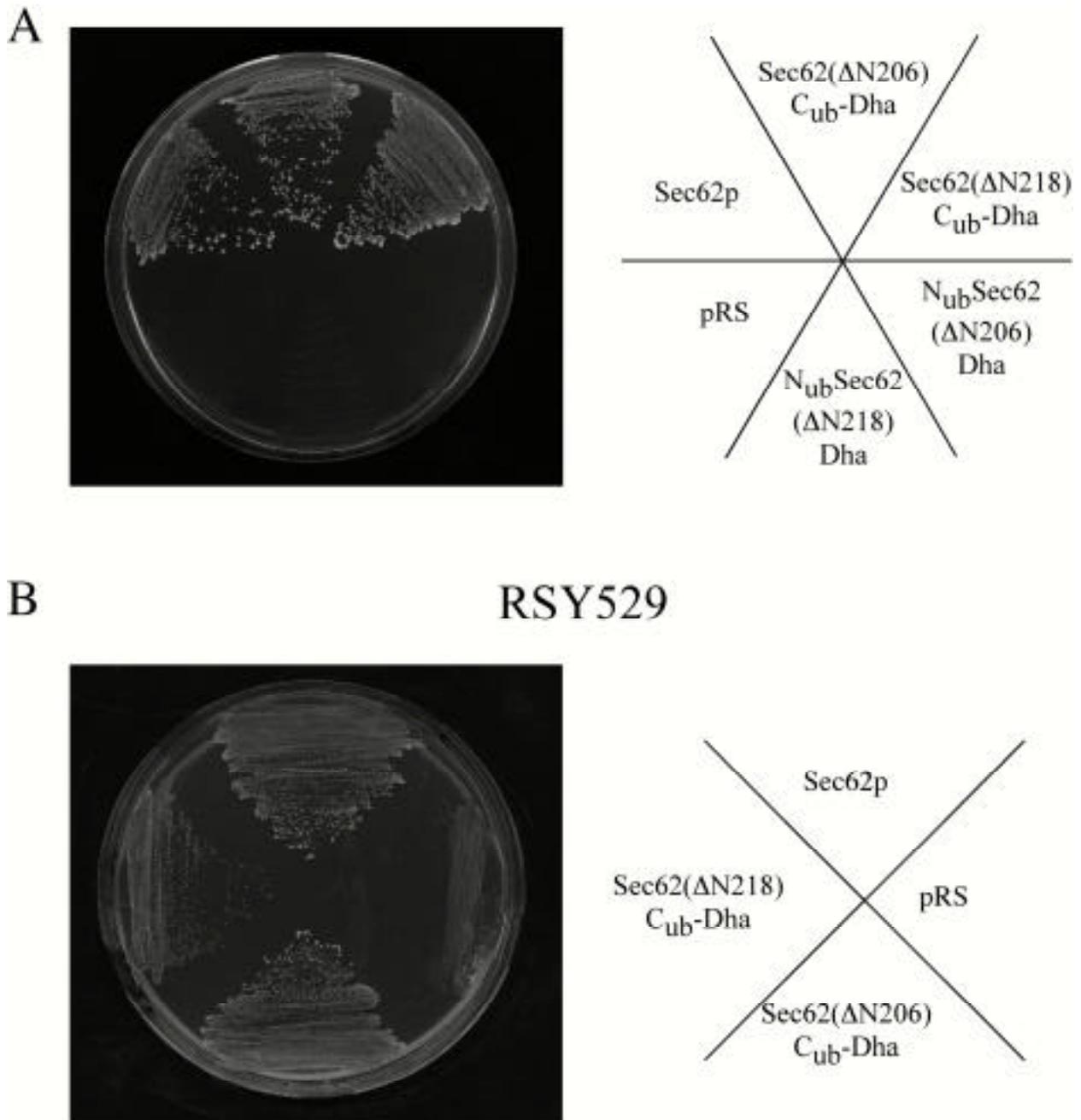


Abb. 3.29 Die Funktionalität der hochkonservierten Domäne des Sec62p. Hefezellen, die neben den angegebenen Deletionsmutanten des Sec62p noch zusätzlich das FLAG-Sec62p von einem Plasmid exprimieren, wurden auf eine FOA-Platte aufgetragen und nach einer dreitägigen Inkubation bei 30°C dokumentiert. **B** Dargestellt sind Hefezellen des Stammes RSY 529, der ein temperatursensitives Allel des *SEC62* (*sec62-1*) trägt. Die Zellen exprimieren die angegebenen Versionen von Sec62p bzw. ein Leerplasmid. Die Zellen wurden in Flüssigkultur angezogen und auf eine SD-Platte aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte nach einer dreitägigen Inkubation bei 35°C.

3.5.3.2 Die Interaktion zwischen $N_{ub}Sec62(\Delta N206)Dha$ oder $N_{ub}Sec62(\Delta N218)Dha$ und $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$

Können die C-terminalen Abschnitte des Sec62p in den Fusionsproteinen $N_{ub}Sec62(\Delta N206)Dha$ und $N_{ub}Sec62(\Delta N218)Dha$ noch mit dem Translokationssubstrat $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$ reagieren? Um diese Frage zu klären, wurden die beiden N_{ub} -Fusionsproteine mit $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$ in Wildtyp-Hefezellen exprimiert. Zum Vergleich wurden Zellen eingesetzt, die $N_{ub}Sec62p$, $N_{ub}Sec62(\Delta C60)Dha$ und $N_{ub}Guk1hap$ zusammen mit $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$ exprimieren. $N_{ub}Sec62p$ soll dabei als positive Kontrolle fungieren. Neben der unter 3.3.2 beschriebenen sehr schwachen Interaktion zwischen $N_{ub}Sec62(\Delta C60)Dha$ und dem Translokationssubstrat wurde nun auch das zytosolische Fusionsprotein $N_{ub}Guk1hap$ verwendet. Da $N_{ub}Sec62(\Delta N206)Dha$ und $N_{ub}Sec62(\Delta N218)Dha$ keine der beiden Transmembrandomänen des nativen Sec62p mehr aufweisen, wurde vermutet, dass sich die Fusionsproteine im Zytosol aufhalten. Durch $N_{ub}Guk1hap$ sollte ein neutrales N_{ub} -Fusionsprotein, das ebenfalls zytosolisch lokalisiert ist, repräsentiert sein.

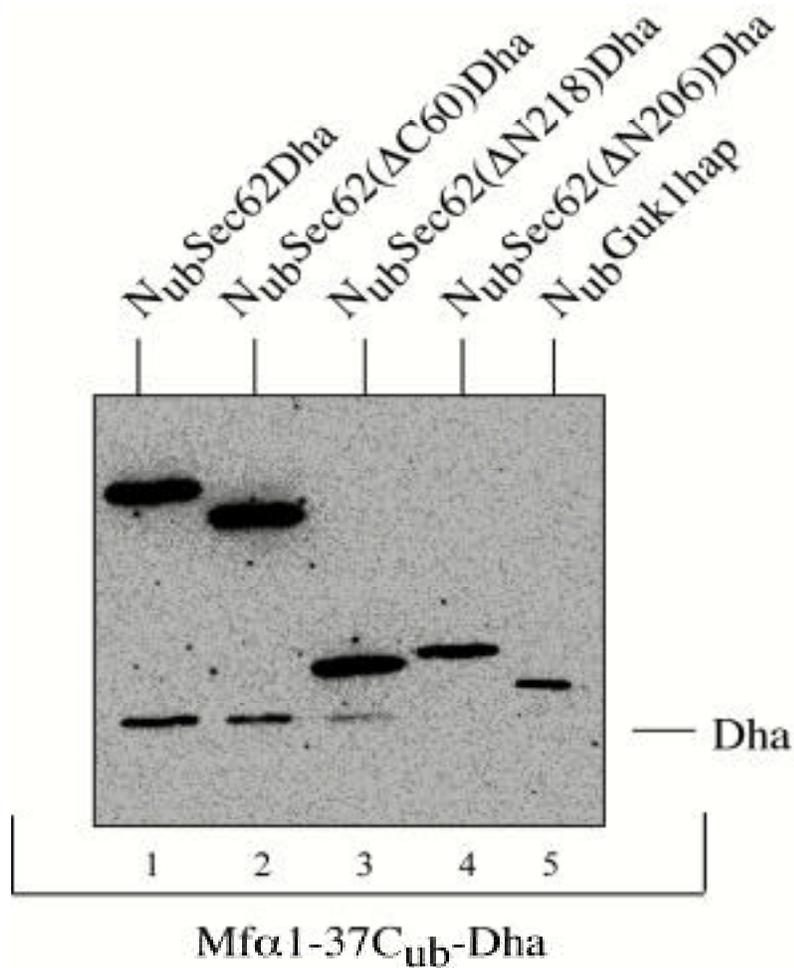


Abb. 3.30 Die Proximität von N_{ub}Sec62(Δ N206)Dha und N_{ub}Sec62(Δ N218)Dha zu Mf α 1-37C_{ub}-Dha. Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine koexprimieren, wurden aufgeschlossen, die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

Das durch die Reaktion freigesetzte Dha kann bei der Koexpression von N_{ub}Sec62(N218)Dha und Mf 1-37C_{ub}-Dha auch bei der starken Exposition des Blottes in Abb. 3.30 nur in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden (Spur 3). Dieses Signal bleibt in seiner Intensität weit hinter dem zurück, das bei der Koexpression von N_{ub}Sec62Dha, aber auch bei der Koexpression von N_{ub}Sec62(C60)Dha mit Mf 1-37C_{ub}-Dha entsteht (Spuren 1 und 2). Kein abgespaltenes Dha ist bei der Koexpression von N_{ub}Sec62(N206)Dha und N_{ub}Guk1hap mit dem C_{ub}-Translokationssubstrat zu detektieren.

3.5.3.3 Die zelluläre Lokalisation von Sec62(Δ N206) C_{ub} -Dha und Sec62(Δ N218) C_{ub} -Dha

Zur weiteren Charakterisierung der Deletionsmutanten Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha, sollte zunächst deren Lokalisation innerhalb der Zelle geklärt werden. Dabei stand folgende Frage im Mittelpunkt: Befinden sich die Deletionsmutanten genauso wie das native Sec62p im Sec-Komplex? Verschiedene experimentelle Ansätze wurden zur Beantwortung dieser Frage angewandt.

3.5.3.3.1 Die differentielle Zentrifugation von Sec62(N206) C_{ub} -Dha

Mit der Methode der differentiellen Zentrifugation kann geklärt werden, ob Proteine sich im Zytosol aufhalten, oder ob sie an Membranen assoziiert vorliegen bzw. in Membranen integriert sind (z.B.: Ziman et al., 1993). Für die Sec62p-Deletionsmutante Sec62(N206) C_{ub} -Dha ist dies von großem Interesse. Da diese Deletionsmutante keine der beiden putativen Transmembran-Segmente des Sec62p mehr enthält, würde eine Membranlokalisation für eine direkte Wechselwirkung mit anderen Proteinen des Sec-Komplexes sprechen.

Für die differentielle Zentrifugation wurden Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, aufgeschlossen und dieser Extrakt verschiedenen Zentrifugationsschritten unterzogen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem Anti-HA-Antikörper bzw. mit dem Anti-Sec62p-Antikörper in der Western-Blot-Analyse.

Die differentielle Zentrifugation von Sec62(N206) C_{ub} -Dha ergab, dass zumindest ein Teil des Proteins membrangebunden ist.

Nach den verschiedenen Zentrifugationsschritten war sowohl im Überstand, in dem zytosolische Proteine aufzufinden sind, als auch in den Pellet-Fractionen, die Membranproteine oder membranassoziierte Proteine aufkonzentrieren, ein Anteil des Fusionsproteins zu detektieren (Abb. 3.31 **D**). Zur Kontrolle wurde die differentielle Zentrifugation auch mit dem Membranprotein Sec62p durchgeführt (**A**). Hier ist deutlich zu erkennen, dass der überwiegende Teil des Proteins in der Membran-Fraktion aufzufinden ist (P3). Als Kontrolle dient das zytosolische Protein Tpi1 C_{ub} -Dha (**B**). Der größte Anteil dieses Proteins ist im Überstand

aufzufinden (S). Ein signifikanter Teil zytosolischer Proteine befindet sich jedoch auch in den Pellet-Fractionen. Dies ist sehr wahrscheinlich auf Unvollkommenheiten bei der Präparation der Fraktionen zurückzuführen. Das gleiche kann somit auch für Sec62(Δ C125)Dha gelten (C). Da diese Deletionsmutante genauso wie Sec62(Δ N206)C_{ub}-Dha keine Transmembrandomänen enthält, sollte es zytosolisch sein.

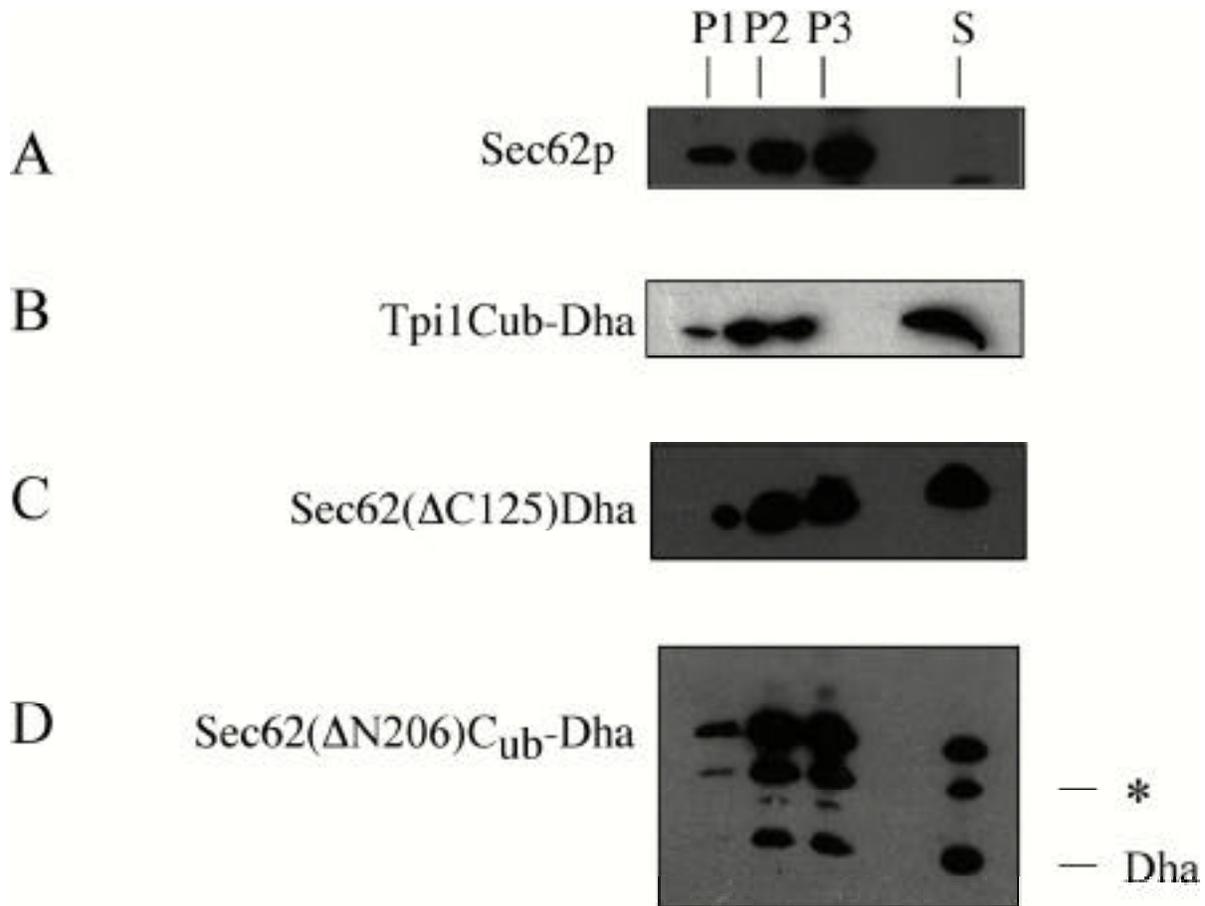


Abb. 3.31 Die Deletionsmutante Sec62(Δ N206)C_{ub}-Dha ist zum Teil membranassoziiert. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen Proteine exprimieren, wurden aufgeschlossen und einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. Die Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure gefällt und gleiche Volumina in 12%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers (bei Tpi1Cub-Dha, Sec62(Δ C125)Dha und Sec62(Δ N206)C_{ub}-Dha) bzw. mit Hilfe des Anti-Sec62p-Antikörpers (bei Sec62p). P1 bezeichnet die Pellet-Fraktion des ersten Zentrifugationsschrittes bei 500g. P2 bezeichnet die Pellet-Fraktion des zweiten Zentrifugationsschrittes bei 10000g und P3 die des dritten Zentrifugationsschrittes bei 100000g. S bezeichnet den Überstand des dritten Zentrifugationsschrittes.

Nach der differentiellen Zentrifugation des Sec62(N206) C_{ub} -Dha kann neben dem stärksten Signal im Überstand wiederum ein Teil des Proteins in den Pellet-Fractionen nachgewiesen werden.

Ein Problem, das sich beim Arbeiten mit den Fusionsproteinen Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha ergibt, ist die hohe Rate an Abspaltung des Dhas. Das abgespaltene Dha stellt oft den überwiegenden Teil des jeweils nachgewiesenen Proteins auf den Western-Blots dar. Darüber hinaus erscheint ein zusätzliches Signal auf dem Western-Blot. Dieses läßt sich wahrscheinlich auf unspezifische Proteolyse von Sec62(N206) C_{ub} -Dha während des Experimentes zurückführen, oder repräsentiert eine Protein-Spezies, die durch die Translationsinitiation an einem anderen Start-Codon als dem ersten innerhalb der Fusionsproteine entsteht.

Durch verschiedene Extraktionsmethoden der Proteine aus der Membran-Fraktion sollte geklärt werden, welche Art der Interaktion einen Teil des Sec62(N206) C_{ub} -Dha an die Membran rekrutiert (Ziman et al., 1996). Starke Detergenzien wie SDS oder Triton X-100 vermögen Transmembranproteine aus den Lipiddoppelschichten herauszulösen, so dass sie nach einem weiteren Zentrifugationsschritt nicht mehr im Pellet, sondern im Überstand aufzufinden sind. Proteine, die etwa über die geladenen Phospholipid-Untereinheiten an die Membranen gekoppelt sind, können durch die Extraktion mit einer hohen Salzkonzentration aus den Membran-Fractionen gelöst werden. Proteine, die über starke Protein-Protein-Interaktionen an die Membran gekoppelt sind, sollten durch denaturierende Reagenzien wie Harnstoff aus der Membran gelöst werden.

Das Membran-Pellet, das einen Teil des Sec62(N206) C_{ub} -Dha enthält, wurde mit SDS, Triton, einer hohen Konzentration an NaCl oder Harnstoff behandelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Pellet- und Überstand-Fractionen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. Lediglich die Anwesenheit von 1% SDS führte dazu, das Sec62(N206) C_{ub} -Dha nicht mehr im Membran-Pellet, sondern im Überstand aufzufinden ist (Abb. 3.32 A, Spur 3 und 4). Die Behandlung mit den anderen Reagenzien veränderte die Verteilung des Sec62(N206) C_{ub} -Dha kaum. Beim Einsatz von 0,5 M NaCl läßt sich sogar ein größerer Teil des Fusionsproteins im Membranpellet nachweisen als ohne NaCl (Spur 7 und 8). Zur Kontrolle wurde das Extraktionsverhalten der

Transmembranproteine Sec62p und Sec61p betrachtet (**B** und **C**). Zum Nachweis dieser Proteine wurde wieder der Anti-Sec62p-Antikörper bzw. ein Anti-Sec61p-Antikörper verwendet.

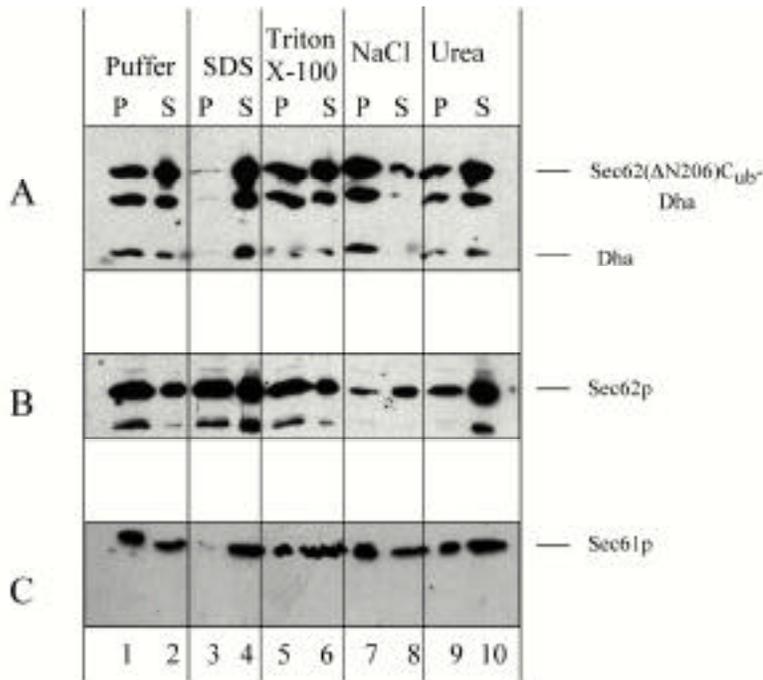


Abb. 3. 32 Die Extraktion des Sec62(Δ N206) C_{ub} -Dha aus der Membranfraktion. Wildtyp-Hefezellen, die Sec62(Δ N206) C_{ub} -Dha exprimieren, wurden aufgeschlossen und einer Zentrifugation bei 500g unterzogen. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde wieder zentrifugiert (bei 10000g). Das Pellet dieses Zentrifugationsschrittes wurde mit den verschiedenen Extraktionspuffern behandelt und erneut bei 10000g zentrifugiert. Überstand (S) und Pellet (P) wurden mit Trichloressigsäure gefällt und die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe der im Text angegebenen Antikörper. Spur 1 und 2: Puffer, Spur 3 und 4: Puffer mit 1% SDS, Spur 5 und 6: Puffer mit 2% Triton X-100, Spur 7 und 8: Puffer mit 0,5M NaCl, Spur 9 und 10: Puffer mit 1,6M Harnstoff.

Während sich Sec61p eher wie ein typisches Transmembranprotein verhält, das sich bei der Anwesenheit der Detergenzien (SDS oder Triton X-100) aus dem Membranpellet löst (**C**, Spur 3 und 4 sowie Spur 5 und 6), ist das Extraktionsverhalten von Sec62p nicht eindeutig. SDS vermag Sec62p nicht aus der Membran-Fraktion zu lösen und Triton X-100 befördert nur einen Teil des Proteins in die lösliche Fraktion (**B**, Spur 3 und 4 sowie Spur 5 und 6). Dieses atypische Extraktionsverhalten macht auch die Deutung des Experimentes mit Sec62(Δ N206) C_{ub} -Dha

schwierig. Auch die Wechselwirkungen, die Sec62(N206)C_{ub}-Dha an der Membran halten, können somit nicht genau bestimmt werden.

3.5.3.3.2 Die Nähe von Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha zu Sec61p, zu Ssh1p oder zu Bos1p gemessen mit dem Split-Ub-System

Ein weiterer Versuch, die Deletionsmutanten Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha etwas genauer zu charakterisieren, war die Untersuchung ihrer Nähe zu Sec61p, zu Ssh1p oder zu Bos1p. Können Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha mit anderen Komponenten des Sec-Komplexes interagieren, so müsste sich dies in einer größeren Nähe zum Sec61p als zum Ssh1p und zum Bos1p ausdrücken. Sec61p ist Teil des heptameren Sec-Komplexes, während Ssh1p und Bos1p nicht in Verbindung zu diesem Protein-Komplex stehen.

Um diese Frage mit dem Split-Ub-System zu untersuchen, wurden die Fusionsproteine Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha alleine oder mit N_{ua} - oder N_{ug} Sec61p bzw. N_{ua} - oder N_{ug} Ssh1p in Wildtyp-Hefezellen koexprimiert. Als weitere Kontrolle dienten die Fusionsproteine N_{ua} - und N_{ug} Bos1p. Der Nachweis des Reporterproteins erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

Der Einsatz der N_{ub} -Fusionsproteine führt zu einer so starken Abspaltung des Dha, dass eine Differenzierung nicht mehr möglich ist (nicht gezeigt). Deshalb wurde die Reaktion der Mutanten N_{ua} und N_{ug} für die Interpretation dieses Experimentes herangezogen. Die herabgesetzte Affinität der N_{ua} - und N_{ug} -Fusionsproteine zum C_{ub} erleichtert eine Unterscheidung der Nähe von Sec62(N206) C_{ub} -Dha und Sec62(N218) C_{ub} -Dha zu Sec61p, Ssh1p und Bos1p.

Abgespaltenes Dha ist bei der Koexpression aller N_{ua} - und N_{ug} -Fusionsproteine zu erkennen (Abb. 3.33). Da sich die Sec62 C_{ub} -Fusionsproteine zumindest zum Teil an der ER-Membran aufhalten, kommt es zu dieser Interaktion mit den N_{ua} - und N_{ug} -Fusionsproteinen, die ebenfalls alle in der ER-Membran lokalisiert sind. Bei der genaueren Betrachtung der Stärke des Signals für abgespaltenes Dha fällt allerdings auf, dass bei der Koexpression von Sec62(N206) C_{ub} -Dha mit N_{ua} - bzw. N_{ug} Sec61p (Spur 3 und 4) mehr vom Reporterprotein freigesetzt wird, als bei der Koexpression mit N_{ua} - oder N_{ug} Ssh1p (Spur 7 und 8). N_{ua} - und N_{ug} Bos1p setzten im Vergleich die geringste Menge an Dha frei, wenn sie mit Sec62(N206) C_{ub} -Dha koexprimiert werden (Spur 11, 12, 13 und 14). Dies spricht dafür, dass Sec62(N206) C_{ub} -Dha zu einem gewissen Grad eine spezifische Affinität zu N_{ua} - oder N_{ug} Sec61p aufweist. Die Signale an abgespaltenem Dha, die durch die Koexpression von Sec62(N218) C_{ub} -Dha mit den N_{ua} - und N_{ug} -Fusionsproteinen

induziert werden, sind weniger eindeutig. Die geringe Menge an nachweisbarem Protein erlaubt hier keine Aussage über die Spezifität der Interaktion zu N_{ua} - und N_{ug} Sec61p.

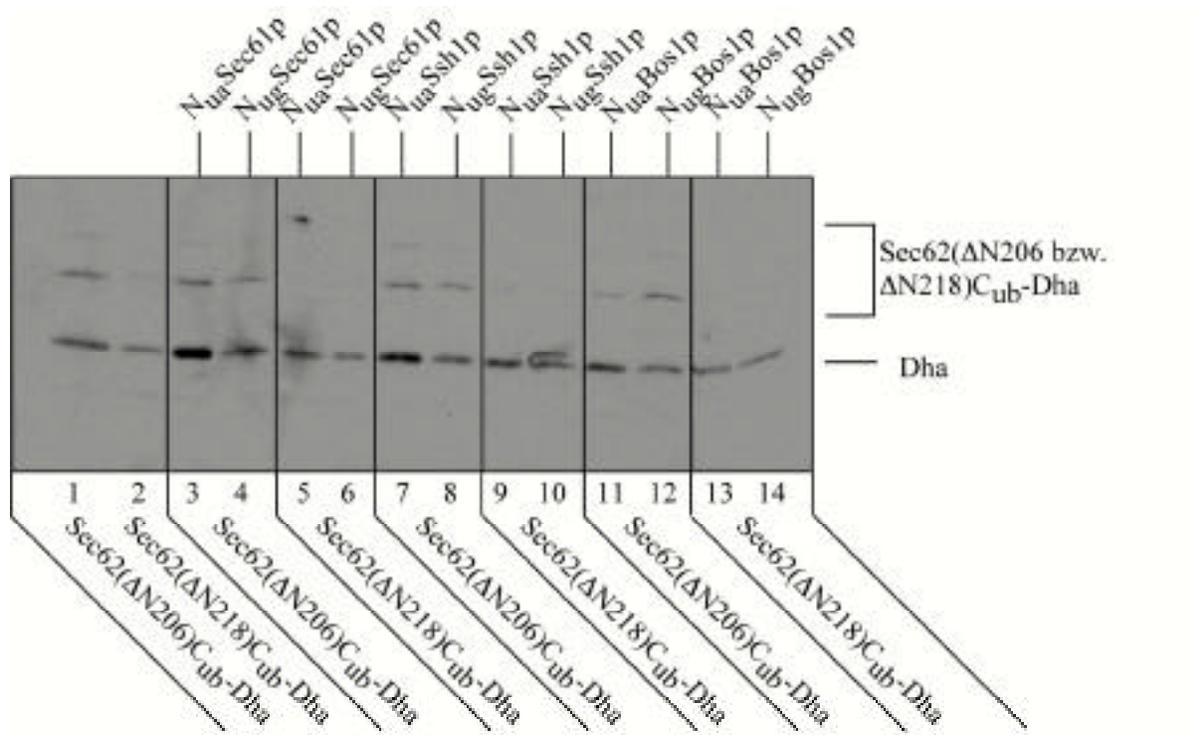


Abb. 3.33 Die Interaktion von Sec62(ΔN206)_{Cub}-Dha und Sec62(ΔN218)_{Cub}-Dha mit N_{ub}Sec61p, N_{ub}Ssh1p und N_{ub}Bos1p. Die angegebenen Fusionsproteine wurden in Wildtyp-Hefezellen koexprimiert, die Zellen aufgeschlossen und die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der mit dem HA-Epitop versehenen Proteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. In diesem Experiment wurden die Mutanten N_{ua} und N_{ug} der N_{ub} -Fusionsproteine verwendet.

Wieder ist der Anteil an ungespaltenem Sec62(ΔN206)_{Cub}-Dha und Sec62(ΔN218)_{Cub}-Dha nur in sehr geringem Maße nachzuweisen. Wie bei der differentiellen Zentrifugation erweisen sich die eingesetzten Sec62p-Derivate als sehr instabil. Das macht eine Bestimmung des Verhältnisses von gespaltenem zu ungespaltenem Anteil der C_{ub} -Fusionsproteine unmöglich. Im Vergleich der verschiedenen Reaktionen wird somit nur die absolute Menge an freigesetztem Dha betrachtet. Die Mengen an Gesamtprotein-Extrakten, die innerhalb eines Experimentes eingesetzt werden, werden angeglichen. Dies hat zur Folge, dass im Mittel Anteile des abgespaltenen Dha im Western-Blot analysiert werden, die für die jeweilige Reassoziationsfähigkeit der N_{ua} - bzw. N_{ug} -

Fusionsproteine mit den C_{ub} -Fusionsproteinen spezifisch sind. Auf diese Weise kann die Quantifizierung der Menge des abgespaltenen Dha alleine schon Auskunft über die Nähe der eingesetzten Fusionsproteine geben.

Für diese Quantifizierung wurde beispielhaft die Interaktion zwischen den Fusionsproteinen $N_{ua}Sec61p$, $N_{ua}Ssh1p$ und $N_{ua}Bos1p$ mit $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha ausgewählt. Der Wert für abgespaltenes Dha bei der Koexpression von $N_{ua}Sec61p$ und $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha wurde als 100 angesehen und die anderen Werte dazu in prozentualer Relation gesetzt.

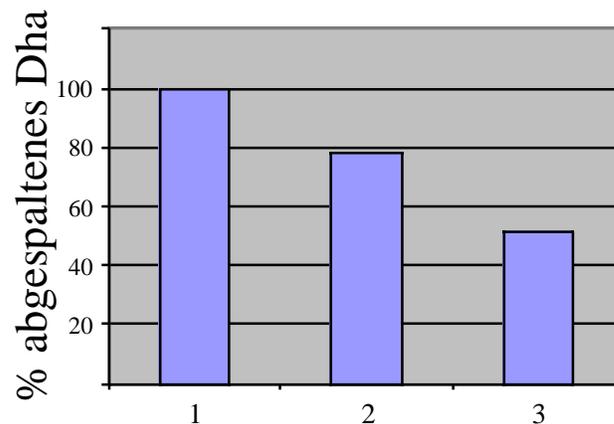


Abb. 3.34 Die Quantifizierung der Nähe von $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha zu $N_{ua}Sec61p$, $N_{ua}Ssh1p$ und $N_{ua}Bos1p$. Zur Quantifizierung mit dem Lumiimager wurden drei unabhängige Experimente wie in Abb. 3.33 verwendet. Die Werte für abgespaltenes Dha bei der Koexpression von $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha und $N_{ua}Sec61p$ wurden als 100 gesetzt (1) und der Anteil an abgespaltenem Dha bei der Koexpression von $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha und $N_{ua}Ssh1p$ (2) oder $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha und $N_{ua}Bos1p$ (3) sind in prozentualem Verhältnis dazu angegeben. Der mittlere quadratische Fehler der aus den drei Experimenten errechneten Mittelwerte lag immer unter 8%.

Die Quantifizierung zeigt deutlich, dass die $Sec62p$ -Deletionsmutante $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha am stärksten mit $N_{ua}Sec61p$ interagiert. Die Menge an abgespaltenem Dha wird von keinem der beiden anderen N_{ua} -Fusionsproteine erreicht. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass $Sec62(\Delta N206)C_{ub}$ -Dha zu mindestens teilweise oder temporär im Sec-Komplex lokalisiert ist.

3.5.3.3.3 Der Versuch der Ko-Immunopräzipitation von Sec62(N206)_{C_{ub}}-Dha und Sec62(N218)_{C_{ub}}-Dha mit einem zytosolischen Teil des Sec63p

Mit der Methode der Ko-Immunopräzipitation sollte die Interaktion von Sec62(N206)_{C_{ub}}-Dha und Sec62(N218)_{C_{ub}}-Dha mit einem Protein des Sec-Komplexes, dem Sec63p, direkt getestet werden. Da beide Sec62p-Fragmente auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert sind, wurde dazu gezielt die große zytosolische Domäne des Sec63p verwendet. Diese lag in dem Fusionsprotein FLAG-Sec63(N244)p vor.

Hefezellen, die nach einem Plasmidaustausch Sec62(N206)_{C_{ub}}-Dha bzw. Sec62(N218)_{C_{ub}}-Dha als einzige Versionen des Sec62p zusammen mit FLAG-Sec63(N244)p exprimieren, wurden verwendet. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die membranösen Fraktionen abzentrifugiert. Der zytosolische Extrakt wurde dann mit dem Anti-FLAG-Antikörper behandelt. Das Immunopräzipitat wurde anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden Western-Blot erfolgte der Nachweis ko-immunopräzipitierter Proteine mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

In diesem Experiment kann keine Interaktion des FLAG-Sec63(N244)p mit Sec62(N206)_{C_{ub}}-Dha oder mit Sec62(N218)_{C_{ub}}-Dha nachgewiesen werden. Die beiden Sec62p-Derivate sind auf dem Western-Blot in Abb. 3.35 **A** nicht zu detektieren (Spur 1 und 2). Dies gilt auch für die Negativkontrolle, bei der FLAG-Sec63(N244)p mit Tpi1_{C_{ub}} Dha koexprimiert wurde (Spur 3). Bei der gleichzeitigen Expression von Sec62(C125)Dha mit FLAG-Sec63(N244)p kann, wie schon zuvor gezeigt (Wittke et al., 2000), die Ko-Immunopräzipitation der beiden Fusionsproteine nachgewiesen werden (Spur 4).

Um die Menge der eingesetzten Fusionsproteine zu überprüfen, wurde der Überstand der Anti-FLAG-Präzipitation mit Anti-HA-Antikörper behandelt und mit Anti-HA-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. So wurde sichergestellt, dass ein ausreichend großer Anteil an Sec62p-Fusionsproteinen in der zytosolischen Fraktion, die zur Ko-Immunopräzipitation eingesetzt wurde, vorliegt (Abb. 3.35 **B**).

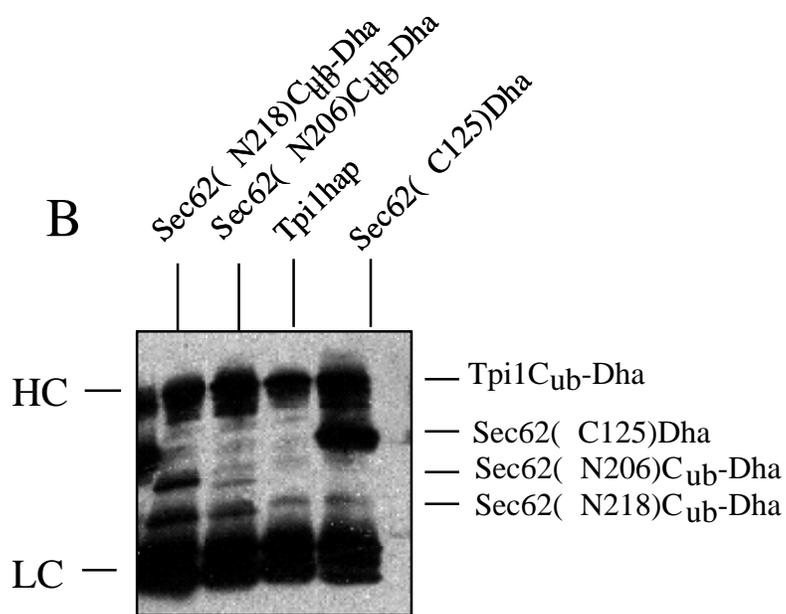
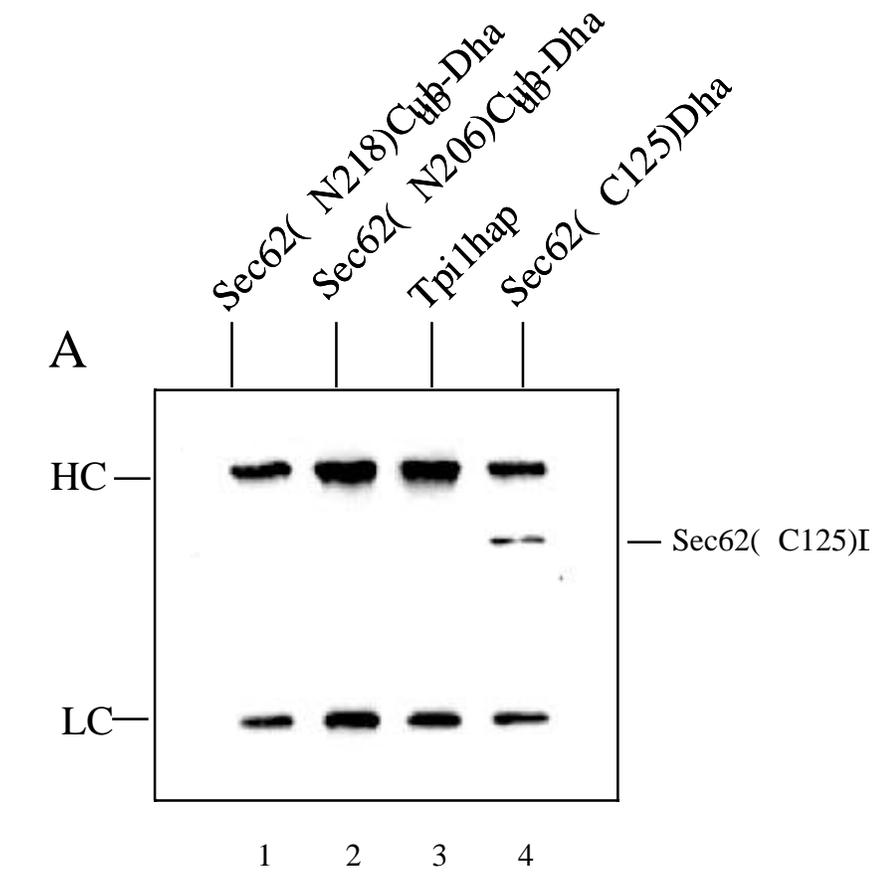


Abb. 3.35 (s. vorige Seite) Sec62(Δ C125)Dha, aber nicht Sec62(Δ N206) C_{ub} -Dha und Sec62(Δ 218) C_{ub} -Dha kopräzipitiert mit einem zytosolischen Fragment von Sec63p. A Wildtyp-Hefezellen, die die angegeben Deletionsmutanten von Sec62p sowie Tpi1 C_{ub} -Dha zusammen mit FLAG-Sec63(N244)p exprimieren, wurden aufgeschlossen und mit dem Anti-FLAG-Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der kopräzipitierten Proteine erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. **B** Die Überstände der Immunpräzipitationen in **A** wurden gefällt und in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers. HC = schwere Immunoglobulin-Kette, LC = leichte Immunoglobulin-Kette. Um ein höheres Expressionsniveau der eingesetzten Proteine zu erreichen, wurde der CUP1-Promotor, der die Expression aller Fusionsproteine auf den Plasmiden steuert, durch die Zugabe von 100 μ M Cu_2SO_4 induziert.

Auch der Einsatz des Anti-HA-Antikörpers zur Präzipitation der anschließende Nachweis der Proteine mit dem Anti-FLAG-Antikörper hatte das gleiche Ergebnis. Während die Interaktion zwischen Sec62(C125)Dha und FLAGSec63(N244)p auch bei dieser umgekehrten Vorgehensweise detektiert werden kann, ist keine Wechselwirkung zwischen Sec62(N206) C_{ub} -Dha oder Sec62(N218) C_{ub} -Dha mit FLAG-Sec63(N244)p nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

3.6 Die Funktion des Ssh1p-Komplexes bei der Translokation von Proteinen in das ER

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob der alternative trimere Sec-Komplex, der Ssh1p-Komplex, in *S. cerevisiae* eine Funktion bei der Translokation von Proteinen in das ER ausübt. Bisher ist lediglich die Zusammensetzung dieses Protein-Komplexes detailliert beschrieben worden (Finke et al., 1996). Deshalb wurde versucht, mit Hilfe des Split-Ub-Systems die Wechselwirkung von Ssh1p und Sbh2p mit ER-Translokationssubstraten zu charakterisieren. Der Einfluß des Ssh1p-Komplexes auf die ER-Translokation sollte auch mit alternativen Methoden analysiert werden.

Beim Ssh1p-Komplex handelt es sich um einen redundanten, nicht essentiellen Proteinkomplex. Dies kann die Ursache dafür sein, dass mit den bisher durchgeführten Experimenten keine klare Aussage zur seiner Funktion möglich war. Es konnte kein Translokationsdefekt in Zellen ohne Ssh1p nachgewiesen werden (Finke et al., 1996; Ng et al., 1996). Biochemische Untersuchungen zur Funktion des Ssh1p-Komplexes während der Translokation sind bislang nicht durchgeführt worden.

3.6.1 Die Interaktion zwischen N_{ub}Ssh1p und C_{ub}-Translokationssubstraten

Die Arbeiten an Sec62p legten nahe, die Proximität von Translokationssubstraten zu anderen Proteinen, die beim Transport von Proteinen in das ER beteiligt sein könnten, mit Hilfe des Split-Ub-Systems zu untersuchen. Analog wurde ein N_{ub}Ssh1p-Fusionsprotein erstellt, das mit den bekannten Translokationssubstraten Mf 1-37C_{ub}-Dha oder Suc2-23C_{ub}-Dha in Hefezellen koexprimiert wurde. Zusätzlich wurde noch ein Translokationssubstrat eingesetzt, das die Signalsequenz des Prc1p (CPY) trägt (Prc1-35C_{ub}-Dha).

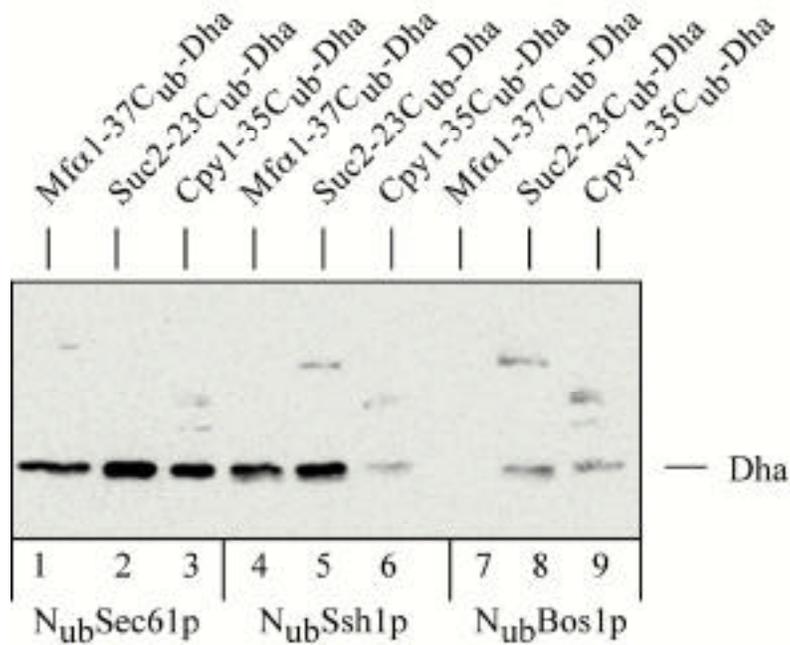


Abb. 3.36 Die Nähe von $N_{ub}Ssh1p$ zu C_{ub} -Translokationssubstraten mit unterschiedlichen Signalsequenzen. Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, wurden aufgeschlossen und die Proteine in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der mit dem HA-Epitop versehenen Proteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

In der Western-Blot-Analyse ist vor allem bei der gleichzeitigen Expression von $N_{ub}Ssh1p$ und $Suc2-23C_{ub}$ -Dha ein deutliches Signal für abgespaltenes Dha zu erkennen (Abb. 3.36, Spur 5). Bei der Koexpression der anderen Translokationssubstrate mit $N_{ub}Ssh1p$ wird dagegen weniger Dha freigesetzt (Spur 4 und 6). Der Vergleich mit der Menge an freigesetztem Dha, die durch die Koexpression mit $N_{ub}Bos1p$ induziert wird, spricht für die Spezifität der Reaktion zwischen $N_{ub}Ssh1p$ und $Suc2-23C_{ub}$ -Dha (Spur 8).

Der ORF, der das Fusionsprotein $N_{ub}Ssh1p$ kodiert, wurde homolog in das Genom der Hefe integriert. Damit ist $N_{ub}Ssh1p$ die einzige Version des $Ssh1p$, die in diesen Zellen exprimiert wird. Da diese Zellen keinerlei Wachstumsdefekt aufweisen wie etwa Zellen, in denen das $SSH1$ -Gen deletiert ist, kann gefolgert werden, dass es sich bei $N_{ub}Ssh1p$ um ein funktionelles Fusionsprotein des $Ssh1p$ handelt (nicht gezeigt).

3.6.2 Die Signalsequenzabhängigkeit der Interaktion zwischen $N_{ub}Ssh1p$ und C_{ub} -Translokationssubstraten

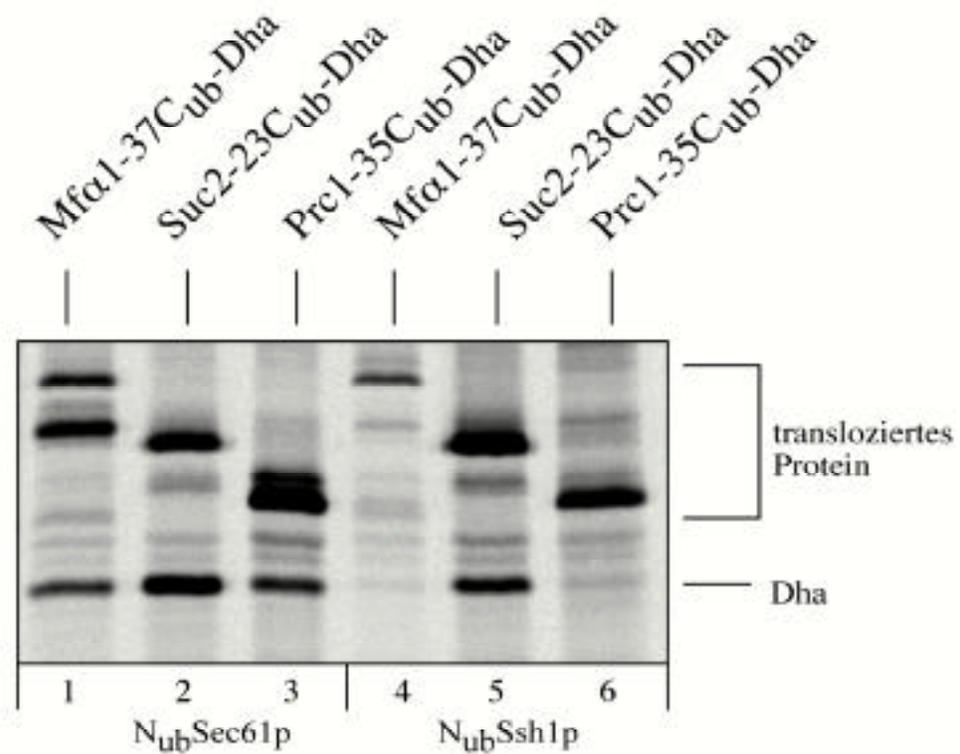
Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse, die mittels des Split-Ub-Systems gewonnen wurden, verlangten eine genauere Betrachtung der Signalsequenzabhängigkeit. Dazu wurde die Reaktion zwischen $N_{ub}Ssh1p$ und den verschiedenen Translokationssubstraten wie in Kapitel 3.2.1 quantifiziert und verglichen. Darüber hinaus diente der Ura3p-Reporter wie in Kapitel 3.2.2 zur Unterstützung dieser Daten.

3.6.2.1 Die Quantifizierung der Interaktion zwischen $N_{ub}Ssh1p$ und C_{ub} -Translokationssubstraten, die unterschiedliche Signalsequenzen tragen.

Hefezellen, die $N_{ub}Ssh1p$ mit den Translokationssubstraten $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha, $Suc2-23C_{ub}$ -Dha oder $Prc1-35C_{ub}$ -Dha exprimieren, wurden radioaktiv markiert und aufgeschlossen. Ungeschnittenes C_{ub} -Translokationssubstrat und geschnittener Dha-Reporter wurden präzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Interaktion zwischen $Suc2-23C_{ub}$ -Dha und $N_{ub}Ssh1p$ am stärksten ist. Hier ist am meisten abgespaltenes Dha nachzuweisen (Abb. 3.37, Spur 5). Die anderen Translokationssubstrate hingegen interagieren so schwach mit $N_{ub}Ssh1p$, dass kaum abgespaltenes Dha nachzuweisen ist (Spur 4 und 6). Der Vergleich dieser Reaktionen mit der Reaktion des $N_{ub}Sec61p$ mit den Translokationssubstraten unterstreicht ihre Spezifität. Bei der Koexpression des $N_{ub}Sec61p$ mit $Suc2-23C_{ub}$ -Dha wird zwar die größte Menge an Dha freigesetzt (Spur 2), aber auch $Mf\ 1-37C_{ub}$ -Dha und $Prc1-35C_{ub}$ -Dha zeigen bei der Interaktion mit $N_{ub}Sec61p$ einen deutlichen Anteil an abgespaltenem Dha (Spur 1 und 3).

A



B

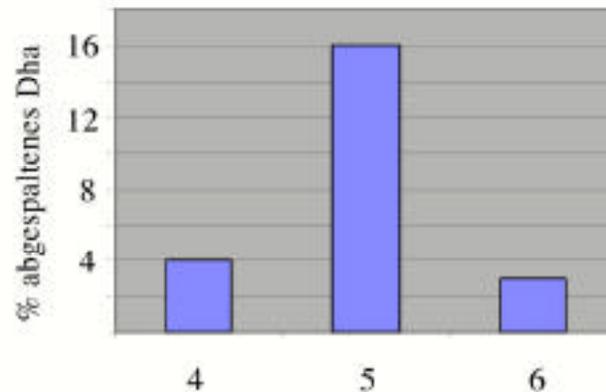


Abb. 3.37 Die spezifische Proximität von Suc2-23Cub-Dha zu $N_{ub}Ssh1p$. **A** Wildtyp-Hefezellen, die die Translokationssubstrate Mf 1-37Cub-Dha, Suc2-23Cub-Dha und Prc1-35Cub-Dha mit $N_{ub}Sec61p$ oder mit $N_{ub}Ssh1p$ exprimieren, wurden für 5 min. mit ^{35}S Methionin radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die mit dem HA-Epitop versehenen Fusionsproteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für drei Tage exponiert. **B** Für die Quantifizierung der Ergebnisse aus **A** mit Hilfe eines Phosphoimagers wurden drei unabhängige Experimente herangezogen. Die Summe aus transloziertem Protein und abgespaltenem Dha wurde als 100 gesetzt und der Anteil an abgespaltenem Dha in Prozent angegeben. Der mittlere quadratische Fehler der Mittelwerte lag immer unter 3%.

3.6.2.2 Der Reporter Ura3p in der Untersuchung der Signalsequenzabhängigkeit der Reaktion zwischen N_{ub}Ssh1p und den C_{ub}-Translokationssubstraten

Als weiterer Beleg der Ergebnisse aus 3.6.2.1 wurden nun Translokationssubstrate verwendet, die an der Stelle des Dha den Reporter Ura3p tragen (s. 3.2.2). Hierbei kommen nur Translokationssubstrate zum Einsatz, die die Signalsequenz des Ψ -Faktors oder die der Invertase tragen (Mf 1-37C_{ub}-Ura3p bzw. Suc2-23C_{ub}-Ura3p). Die Verwendung eines C_{ub}-Translokationssubstrates mit der Signalsequenz des Prc1p und Ura3p als Reporter führte schon ohne die Anwesenheit eines N_{ub}-Fusionsproteins dazu, dass Hefezellen wachsen konnten (Daten nicht gezeigt). Damit ist es für die hier durchgeführten Experimente nicht geeignet.

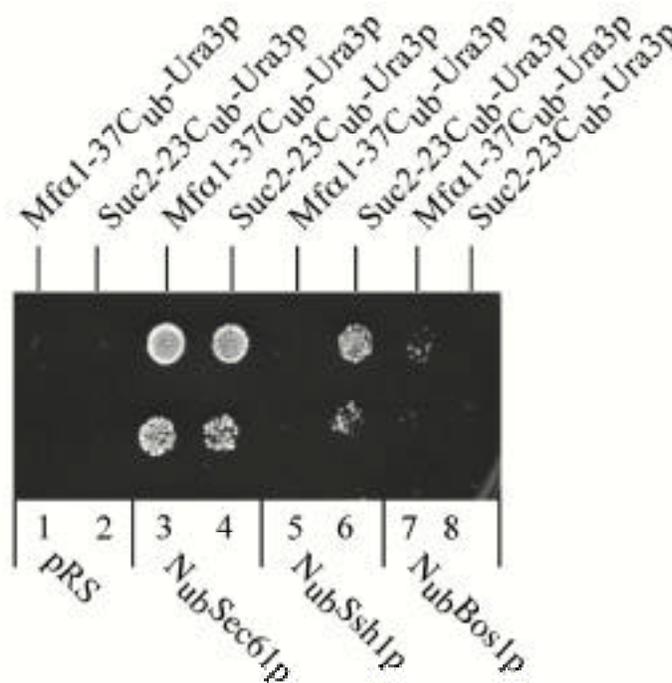


Abb. 3.38 Die Spezifität der Nähe von N_{ub}Ssh1p zu Suc2-23C_{ub}-Ura3p. Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen N_{ub}-Fusionsproteine zusammen mit Mf 1-37C_{ub}-Ura3p oder mit Suc2-23C_{ub}-Ura3p exprimieren, wurden in Flüssigkulturen angezogen und in Verdünnungen von 10⁵ und 10³ Zellen auf eine SD-Platte ohne Uracil aufgetragen. Die Dokumentation der Platte erfolgte nach dreitägiger Inkubation bei 30°C.

Die Fusionsproteine N_{ub}Sec61p (Positivkontrolle), N_{ub}Ssh1p und N_{ub}Bos1p (Negativkontrolle) wurden mit den beiden Translokationssubstraten koexprimiert. In Zellen, die neben dem Translokationssubstrat zusätzlich ein Leerplasmid tragen, wird Mf 1-37C_{ub}-Dha so effizient in das ER transportiert, dass kein Ura3p im Zytosol verbleibt (Abb. 3.38, Reihe 1 und 2). Die Zellen können nicht auf dem Uracil-freien Medium wachsen. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von N_{ub}Sec61 mit Mf 1-37C_{ub}-Dha oder Suc2-23C_{ub}-Dha wird dagegen durch die durch Sec61p induzierte Reassoziierung des N_{ub} mit dem C_{ub} genügend Ura3p ins Zytosol entlassen, um den Zellen Uracil-Prototrophie zu vermitteln (Reihe 3 und 4). Bei den Zellen, die N_{ub}Ssh1p und Mf 1-37C_{ub}-Ura3p oder Suc2-23C_{ub}-Ura3p gleichzeitig exprimieren, wird erneut die Signalsequenzabhängigkeit der Reaktion im Split-Ub-System deutlich. Die Signalsequenz des - Faktors bringt das gekoppelte C_{ub}-Ura3p nicht nahe genug an N_{ub}Ssh1p (Reihe 5). Es wird nicht genügend Ura3p ins Zytosol entlassen, um die Zellen auf dem Uracil-freien Medium wachsen zu lassen. Die Invertase-Signalsequenz führt Suc2-23C_{ub}-Ura3p so dicht an N_{ub}Ssh1p, dass das Ura3p abgespalten wird (Reihe 6). Diese Zellen wachsen, wenn auch nicht so gut wie Zellen, die N_{ub}Sec61p und Suc2-23C_{ub}-Dha gleichzeitig exprimieren. Die Anwesenheit der Translokationssubstrate in Zellen mit N_{ub}Bos1p führt nur für Mf 1-37C_{ub}-Dha zu sehr schwachem Wachstum (Reihe 7 und 8).

3.6.3 Die Interaktion zwischen N_{ub}Sbh1p oder N_{ub}Sbh2p und den C_{ub}-Translokationssubstraten

Ein weiterer Bestandteil des Ssh1p-Komplexes ist Sbh2p. Um die Spezifität der Interaktion zwischen dem Ssh1p-Komplex und dem Translokationssubstrat mit der Signalsequenz der Invertase zu bestätigen, wurde Sbh2p im Split-Ub-System getestet. Als Referenz wurde die Reaktion von Sbh1p mit den beiden Translokationssubstraten herangezogen. Als Bestandteil des trimeren Sec-Komplexes sollte Sbh1p, ähnlich wie Sec61p, allen Translokationssubstraten auf ihrem Weg in das ER gleich nahe kommen.

3.6.3.1 Die Funktionalität von $N_{ub}Sbh1p$ und $N_{ub}Sbh2p$

Zum Funktionalitätstest der beiden $N_{ub}Sbh$ -Fusionsproteine diente ein Hefestamm, YKF 16, bei dem die Gene, die die beiden Proteine Sbh1p und Sbh2p kodieren, deletiert sind. Dieser Hefestamm weist bei einer Temperatur von 37°C ein sehr verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum isogenen Wildtyp auf. Werden aber Sbh1p oder Sbh2p in YKF 16 exprimiert, so wird dieser Wachstumsdefekt komplementiert.

YKF 16-Zellen, die entweder $N_{ub}Sbh1p$ oder $N_{ub}Sbh2p$ exprimieren, bzw. ein Leerplasmid enthalten, wurden zusammen mit isogenen Wildtyp-Hefezellen auf eine Platte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

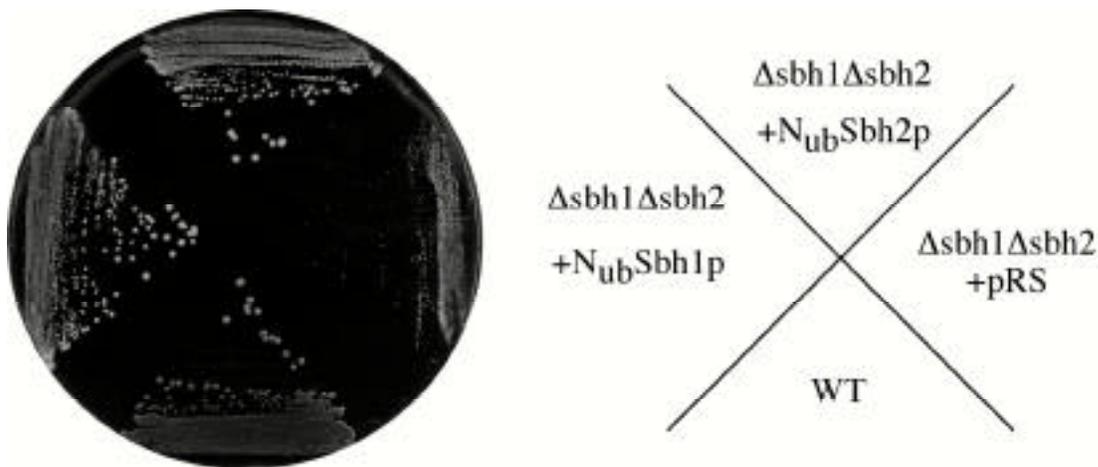
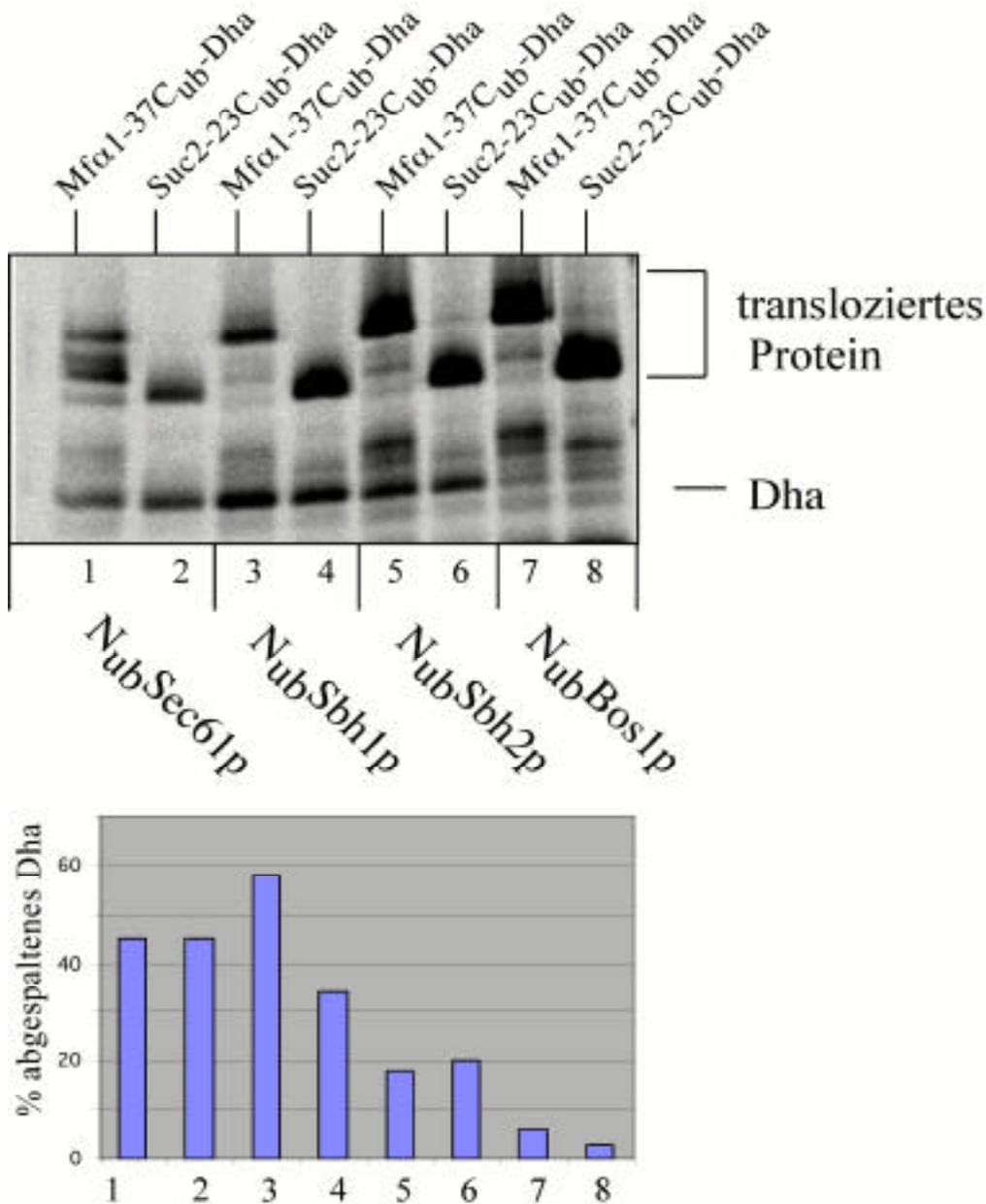


Abb. 3.39 Die Funktionalität der $N_{ub}Sbh1p$ - und $N_{ub}Sbh2p$ -Fusionsproteine. Hefezellen des Doppeldeletionsstammes YKF16 ($\Delta sbh1$, $\Delta sbh2$), die entweder nur ein Leerplasmid enthalten oder $N_{ub}Sbh1p$ bzw. $N_{ub}Sbh2p$ exprimieren, wurden zusammen mit dem isogenen Wildtyp-Hefestamm als Referenz in Flüssigkulturen herangezogen, anschließend auf SD-Platten ausgestrichen und bei der für den Doppeldeletionsstamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert. Das Wachstum der Kolonien wurden nach drei Tagen dokumentiert.

Der Vergleich der Hefe-Kolonien zeigt, dass die YKF-Zellen, die $N_{ub}Sbh1p$ oder $N_{ub}Sbh2p$ exprimieren genauso gut wachsen wie Wildtyp-Zellen (Abb. 3.39). Das Wachstum der YKF 16-Zellen, die den Leerplasmid enthalten, ist hingegen stark verlangsamt. Bei $N_{ub}Sbh1p$ und $N_{ub}Sbh2p$ handelt es sich also um funktionelle Fusionsproteine.

3.6.3.2 Die Interaktion zwischen $N_{ub}Sbh1p$ oder $N_{ub}Sbh2p$ und $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$ oder $Suc2-23C_{ub}-Dha$

$N_{ub}Sbh1p$ und $N_{ub}Sbh2p$ wurden zusammen mit $Mf\alpha 1-37C_{ub}-Dha$ und $Suc2-23C_{ub}-Dha$ in Wildtyp-Hefezellen exprimiert. $N_{ub}Sec61p$ diente als Positiv-Kontrolle und $N_{ub}Bos1p$ als Negativ-Kontrolle.



(Beschreibung der Abb. s. folgende Seite)

Abb. 3.40 Die Proximität von $N_{ub}Sbh1p$ und $N_{ub}Sbh2p$ zu C_{ub} -Translokationssubstraten mit zwei unterschiedlichen Signalsequenzen. A Wildtyp-Hefezellen, die die angegebenen N_{ub} -Fusionsproteine zusammen mit

den Translokationssubstraten Mf 1-37C_{ub}-Dha oder Suc2-23C_{ub}-Dha exprimieren, wurden für 5 min mit ³⁵S Methionin radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die mit dem HA-Epitop versehenen Fusionsproteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für drei Tage exponiert. **B** Das Experiment in **A** wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert. Dabei wurde die Summe der Signale von transloziertem Protein und abgespaltenem Dha als 100 gesetzt und der Anteil an abgespaltenem Dha in Prozent angegeben.

In der Pulse-Analyse ist zu erkennen, dass beide N_{ub}Sbh-Fusionsproteine mit beiden Translokationssubstraten ungefähr gleich stark interagieren können (Abb. 3.40 **A**, Spuren 3, 4, 5 und 6). Die Quantifizierung des Experimentes zeigt, dass das Signal an freigesetztem Dha bei der Koexpression von Mf 1-37C_{ub}-Dha mit N_{ub}Sbh1p am stärksten ist und deutlich für eine spezifische Interaktion spricht. Die weiteren Reaktionen erscheinen nicht so eindeutig. An zweiter Stelle folgt das Signal, das durch die Reaktion von N_{ub}Sbh2p und Suc2-23C_{ub}-Dha hervorgerufen wird. Die Interaktion des N_{ub}Sbh1p mit Suc2-23C_{ub}-Dha scheint, abgesehen von der des N_{ub}Sbh2p mit Mf 1-37C_{ub}-Dha, am schwächsten zu sein. Dieses Ergebnis ist auch durch eine Quantifizierung (Abb. 3.40 **B**) nicht so aussagekräftig wie etwa das der spezifischen Interaktion zwischen N_{ub}Ssh1p und Suc2-23C_{ub}-Dha (3.6.2). Hier kann lediglich von einer Tendenz der Spezifität der Interaktionen zwischen N_{ub}-Sbh-Fusionsproteinen und den beiden C_{ub}-Translokationssubstraten gesprochen werden. Ebenso verhalf der Einsatz des Reporterproteins Ura3p zu keiner klaren Aussage über die Spezifität der Interaktion zwischen beiden N_{ub}-Sbh-Fusionsproteinen und den C_{ub}-Translokationssubstraten mit unterschiedlichen Signalsequenzen (nicht gezeigt).

3.6.4 Das Ub-System zur Charakterisierung der *SSH1*-Deletionsmutante

Um den Einfluß des Ssh1p-Komplexes auf die Translokation weiterhin zu untersuchen, wurde ein zusätzliches experimentelles System, das Ub-System verwendet. Mit Hilfe dieser Methode sollte geklärt werden, ob die gemessene Signalsequenzabhängigkeit der Interaktion zwischen Ssh1p und dem C_{ub}-Translokationssubstraten bestätigt werden kann. Die Signalsequenzen anderer Proteine als bisher, kamen hier zusätzlich zum Einsatz.

3.6.4.1 Das Ub-System

Eine weitere Methode, die ER-Translokation in der lebenden Zelle zu untersuchen, bietet das Ub-System (Johnsson und Varshavsky, 1994; Mason et al., 2000). Hierbei werden Translokationssubstrate verwendet, die C-terminal ihrer ER-Signalsequenz das vollständige Ubiquitin (Ub), gefolgt von einem Reporterprotein (Dha) tragen (Abb. 3.41). Bei der Synthese dieser Translokationssubstrate am Ribosom tritt nun als erstes die Signalsequenz des Proteins in das Zytosol und leitet den Transport in das ER ein. Zwei Szenarien sind für das Ub-System denkbar: Translation und ER-Translokation der Ub-Translokationssubstrate sind so eng gekoppelt, dass das Ub im Zytosol nicht zugänglich ist. Es wird sofort in das Lumen des ER transportiert, ohne dass es im Zytosol falten und von den Ubps erkannt werden kann (**A**). Eine Störung der Translokation kann dazu führen, dass die Synthese und Translokation des Ub-Translokationssubstrates weniger schnell aufeinander folgen. Als Konsequenz gelangt ein großer Teil des Fusionsproteins ins Zytosol, bevor der Transport in das ER initiiert wird (**B**). Somit kann das Ubiquitin im Zytosol der Zellen falten und von den Ubps erkannt werden. Sie spalten C-terminal vom Ub das Reporterprotein ab. Die Menge an abgespaltenem Reporterprotein kann also als Maß für die Effizienz und Geschwindigkeit der ER-Translokation gelten.

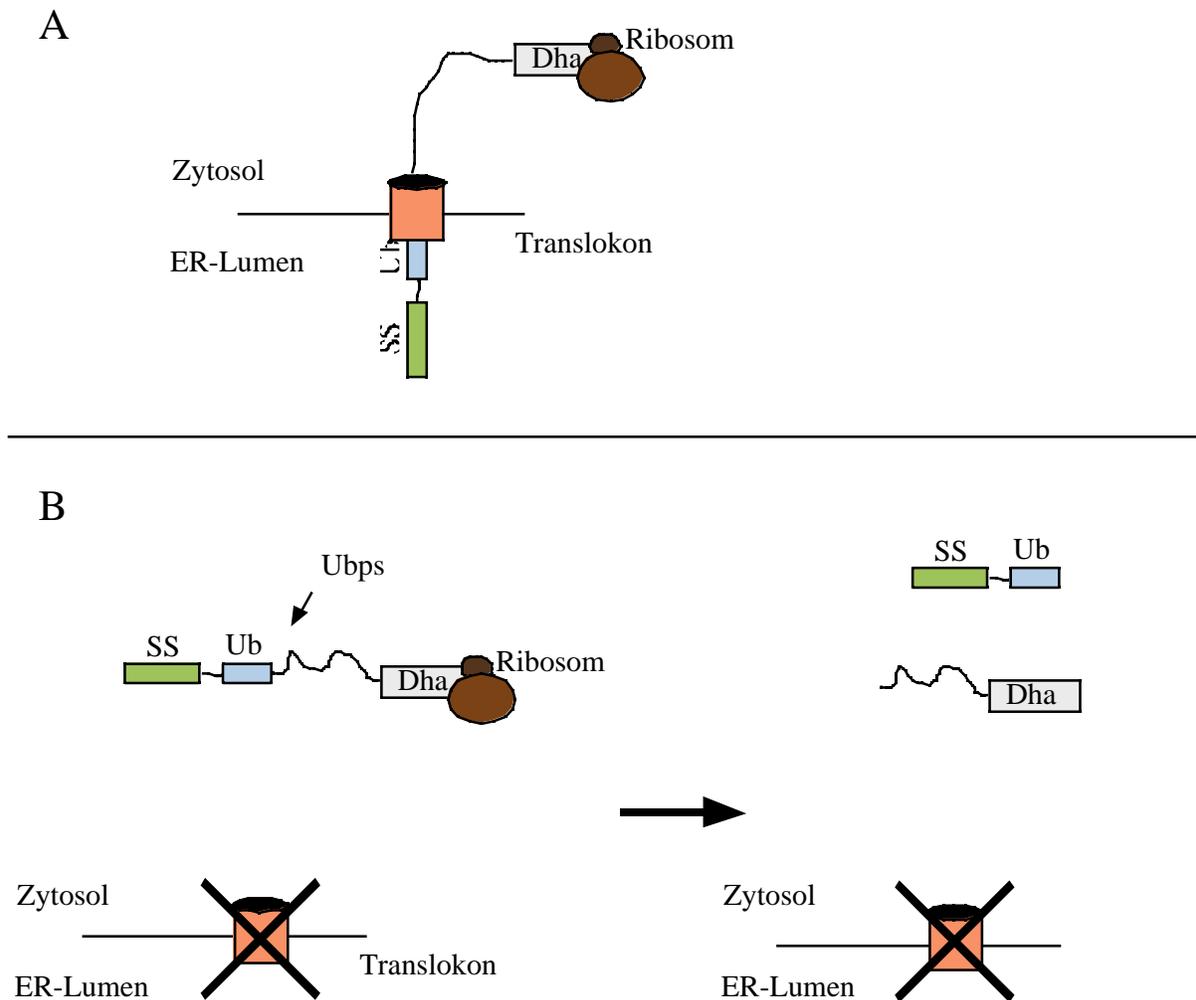


Abb. 3.41 Der Gebrauch des Ubiquitin-Reportersystems zur Erforschung von Translokationsdefekten.

A Bei ungestörter Translokation in das ER wird die Signalsequenz (grünes Rechteck) des Translokationssubstrates rasch erkannt und das Protein wird in das ER transportiert. Die Ubiquitin-Domäne (Ub) wird nicht im Zytosol exponiert. **B** Bei gestörter oder verzögerter Translokation verbleibt das Translokationssubstrat im Zytosol, die Ubiquitin-Domäne wird von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Ubps) erkannt und das Reporterprotein, die Dihydrofolatreduktase mit dem HA-Epitop (Dha), wird C-terminal vom Ubiquitin abgespalten und ins Zytosol entlassen.

Zusätzlich kann, ähnlich wie bei den Experimenten in Kapitel 3.2.2, die Länge der Aminosäuresequenz zwischen der Signalsequenz und dem Ub eine kinetische Auflösung des Translokationsereignisses geben. Ein sehr kurzer Abschnitt zwischen Signalsequenz und Ub hat zur Folge, dass das Ub synthetisiert wird, bevor eine enge Kopplung zwischen

Translokationssubstrat und Ribosom erstellt wird. In diesem Fall verhindert das gefaltete Ub die Translokation und das Rezeptor-Protein wird von den Ubps abgespalten und in das Zytosol entlassen.

Bei einem langen Abschnitt von Aminosäuren zwischen der Signalsequenz und dem Ub ist das Ribosom an den Translokationskanal gekoppelt, bevor das Ub synthetisiert wird. Das Ub transloziert ungehindert in das Lumen des ER und der Reporter wird nicht abgespalten. Auf diese Weise kann der zeitliche Verlauf der ER-Translokation betrachtet werden (Johnsson und Varshavsky, 1994 b)).

3.6.4.1.1 Die verschiedenen Ub-Translokationssubstrate

Als nächstes wurden verschiedene Ub-Translokationssubstrate unter Bedingungen ungestörter Translokation getestet. Hierbei kamen Fusionsproteine mit den Signalsequenzen des α -Faktors (Mf 1p), der Invertase (Suc2p), der Diaminopeptidylpeptidase (Dap1p), des Kar2p, des Prc1p und des Ste6p zum Einsatz. Bei der Dap1p handelt es sich um ein vakuoläres Membranprotein. Als Signalsequenz fungiert hier die Transmembrandomäne des Dap1p. Die Translokation von Transmembranproteinen scheint vornehmlich über den kotranslationalen Translokationsmechanismus unter Mithilfe des SRP zu geschehen. Dies trifft wahrscheinlich auch für das Plasmamembranprotein Ste6p zu. Ste6p ist ein polytopisches Membranprotein und gehört zur Klasse der ABC-Transporter (Übersichtsartikel: Michaelis, 1993). Die erste der zwölf Transmembrandomänen des Ste6p wurde hier als Signalsequenz eingesetzt. Bei Kar2p handelt es sich um das Bip-Homolog in Hefe. Bip ist ein Hitzeschockprotein, das unter anderem an der Faltung von Proteinen im Lumen des ER beteiligt ist (Übersichtsartikel: Gething, 1999). Die Translokation des Kar2p erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen vor allem kotranslational (Ng et al., 1996).

Für die Fusionsproteine mit den Signalsequenzen des α -Faktors, der Invertase und der Diaminopeptidylpeptidase wurden verschieden lange Abschnitte vom N-Terminus des reifen Proteins zwischen Signalsequenz und Ub eingeführt. Die Anzahl der Aminosäuren ist in den Fusionsproteinen hinter den Proteinamen angegeben.

Die verschiedenen Ub-Translokationssubstrate wurden in Wildtyp-Hefezellen exprimiert. Die Zellen wurden radioaktiv markiert und die mit dem HA-Epitop versehenen Proteine mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt.

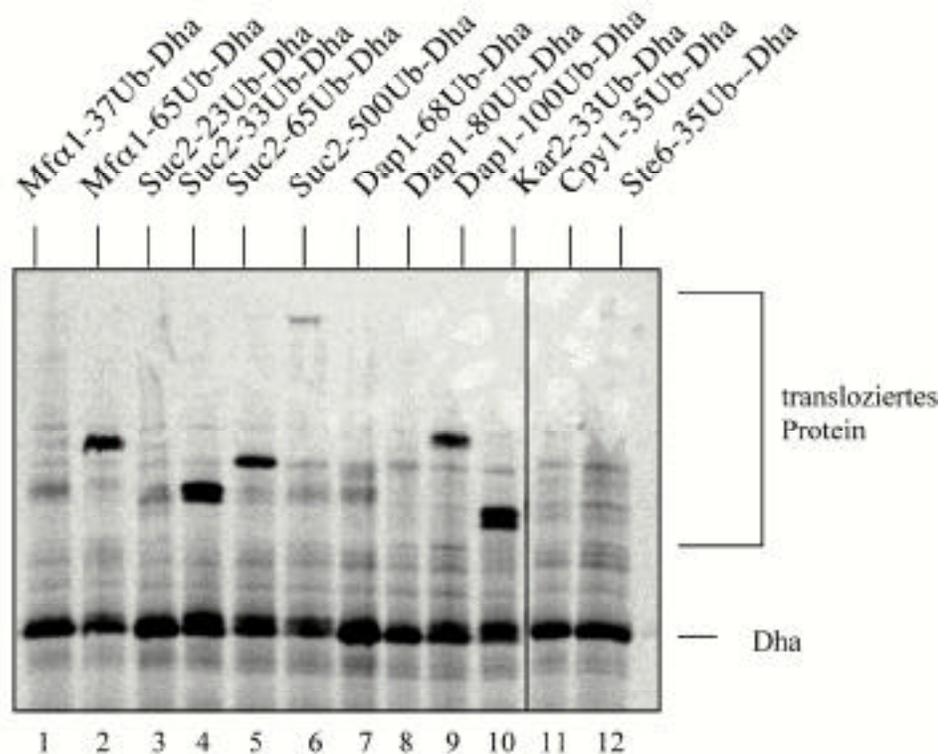


Abb. 3.42 Die verschiedenen Ub-Translokationssubstrate in Wildtyp-Hefezellen. Hefezellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, wurden für 5 min mit radioaktivem ^{35}S Methionin markiert und aufgeschlossen. Die mit dem HA-Epitop versehenen Proteine wurden mit dem Anti-HA-Antikörper präzipitiert und in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für vier Tage exponiert. Die Expression der Translokationssubstrate wurde durch die Induktion des CUP1-Promotors mit $100\ \mu\text{M}$ Cu_2SO_4 induziert.

Das Autoradiogramm zeigt, dass bei der Verwendung aller Ub-Translokationssubstrate Dha freigesetzt wird (Abb. 3.42). Keines der Fusionsproteine wird offensichtlich so schnell oder so effizient in das ER transportiert, dass ein Abspalten des Reporterproteins unmöglich ist. Bei einigen der eingesetzten Ub-Translokationssubstrate erkennt man jedoch einen Anteil translozierten Proteins (Spur 2, 3, 4, 5, 9 und 10). Das heißt, dass zumindest ein Teil dieser

Fusionsproteine vollständig in das ER transportiert wurde, ohne dass Dha freigesetzt werden konnte.

Für Mf 1-37Ub-Dha ist nur abgespaltenes Dha zu erkennen (Spur 1), während bei Mf 1-65Ub-Dha ein Anteil an ungespaltenem Translokationssubstrat zu detektieren ist (Spur 2). Bei Suc2-23Ub-Dha ist wiederum nur ein Signal für Dha zu detektieren (Spur 3), aber bei zunehmender Länge der Aminosäuresequenz zwischen Signalsequenz und Ub (Suc2-33Ub-Dha, Suc2-65Ub-Dha und Suc2-500Ub-Dha) taucht auch transloziertes Protein auf (Spur 4, 5, und 6). Das Signal für transloziertes Suc2-500Ub-Dha ist dabei auffallend schwach. Möglicherweise wird Suc2-500Ub-Dha mit der hier eingesetzten Methode nicht so effizient präzipitiert wie die übrigen Fusionsproteine (Johnsson und Varshavsky, 1994b)). Zwei der Ub-Translokationssubstrate mit der Signalsequenz des Dap1p (Dap1-68Ub-Dha und Dap1-80Ub-Dha), lassen auch nur abgespaltenes Dha erkennen (Spur 7 und 8). Das Fusionsprotein mit dem längsten Abschnitt an Aminosäuren zwischen der Signalsequenz und dem Ub (Dap1-100Cub-Dha) kann allerdings zum Teil als transloziertes, unprozessiertes Fusionsprotein nachgewiesen werden (Spur 9). Das einzige Fusionsprotein mit der Signalsequenz des Kar2p (Kar2-33Ub-Dha) zeigt neben dem abgespaltenen Dha auch einen erheblichen Anteil an transloziertem Protein (Spur 10). Dies trifft nicht für die beiden letzten Ub-Fusionsproteine zu. Prc1p-35Ub-Dha und Ste6-35Ub-Dha sind als translozierte Formen der Fusionsproteine nicht zu erkennen. Nur abgespaltenes Dha kann detektiert werden (Spur 10 und 11).

Ein Unterschied in der Dha-Prozessierung läßt sich also bei den diversen Ub-Translokationssubstraten ablesen. Dieser kann sowohl auf die Verschiedenheit der eingesetzten Signalsequenzen als auch auf die verschieden langen Aminosäureabschnitte zwischen den Signalsequenzen und dem Ub zurückgeführt werden.

Vergleicht man die Proteine gleicher Größe, aber unterschiedlicher Signalsequenzen miteinander, so kann festgestellt werden, dass das Ub-Fusionsprotein mit der Signalsequenz des Kar2p ähnlich schnell, wenn nicht sogar schneller transloziert wird als das Ub-Fusionsprotein mit der Invertase-Signalsequenz und eindeutig schneller als die Ub-Fusionsproteine mit den Signalsequenzen des -Faktors (Spur 1 und 2), des Ste6p (Spur 12) oder des Dap1p (Spur 7-9). Es war überraschend, dass Dap1Ub-Dha nur genauso effizient in das ER transloziert wird wie Mf 1-65Ub-Dha.

3.6.4.1.2 Die Ub-Translokationssubstrate in ER-Translokationsmutanten

Mit den Ub-Translokationssubstraten sollte die Rolle des Ssh1p-Komplexes bei der ER-Translokation untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Ub-Fusionsproteine in Wildtyp-Zellen und in Zellen mit einer Deletion des *SSH1*-Gens exprimiert und die Anteile an abgespaltenem Dha verglichen. Die Streuung der Experimente war so groß und der Effekt der Deletion des *SSH1* auf die Translokation so gering, dass keine eindeutige Aussage gewonnen werden konnte. Es wurde deshalb das Translokationsverhalten eines unmodifizierten Proteins untersucht, von dem bereits gezeigt wurde, dass es SRP-abhängig in das ER transportiert wird (Ng et al., 1996).

3.6.5 Die Translokation des Dap1p in $\Delta SSH1$ -Zellen

Als Alternative zu den bisher getesteten oder entwickelten Verfahren wurde die Reifung des Proteines Dap1p betrachtet, um die Funktion des Ssh1p während der ER-Translokation aufzudecken. Dap1p wird im ER glykosyliert. Das führt zu einem in der SDS-PAGE nachweisbaren höheren Molekulargewicht. Wenn die Translokation des Dap1p gestört ist, erwartet man einen Anstieg in dem Anteil des Proteins, der nicht transloziert wird und daher auch nicht glykosyliert wird. Diese nicht glykosylierte Form des Dap1p kann in der SDS-PAGE aufgrund ihres niedrigeren Molekulargewichtes von der glykosylierten Form separiert werden. Wildtyp-Hefezellen und *ssh1*-Zellen sowie *sec72*-Zellen wurden radioaktiv markiert, aufgeschlossen und Dap1p mit dem Anti-Dap1p-Antikörper präzipitiert.

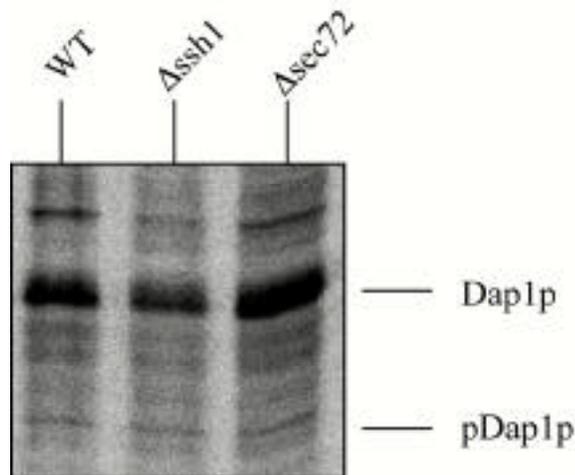


Abb. 3.42 Der Anstau von Dap1p. Wildtyp-Hefezellen (WT), Hefezellen mit einer Deletion des SSH1-Gens bzw. des SEC72-Gens wurden für 10 min mit ^{35}S Methionin radioaktiv markiert, aufgeschlossen und die Proteine mit dem Anti-Dap1p-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für 5 Tage exponiert.

Das Autoradiogramm zeigt, dass in den *ssh1*-Zellen, *sec72*-Zellen und in Wildtyp-Zellen das Muster der präzipitierten Proteine identisch ist (Abb. 3.42). Die Translokation des Dap1p scheint also durch die Abwesenheit von Ssh1p nicht wesentlich gestört zu sein.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung transienter Protein-Interaktionen mit dem Split-Ub-System in lebenden Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob es möglich ist, eine transiente Interaktion zweier Proteine in der Zelle zu messen. Ein Beispiel einer solchen Interaktion ist die Wechselwirkung, die zwischen einem Polypeptid auf seinem Weg über die ER-Membran und Bestandteilen der Translokationsmaschinerie stattfindet. Das Translokationssubstrat wird während oder kurz nach seiner Synthese im Zytosol in das ER geleitet. Die Proteine des trimeren und tetrameren Sec-Komplexes der Hefe *S. cerevisiae* sind an diesem Transport beteiligt (Deshaies, 1991; Panzner *et al.*, 1995). Zur Untersuchung dieser Wechselwirkung wurde das Split-Ub-System benutzt. Hier wurde ein artifizielles Translokationssubstrat verwendet, bei dem das C_{ub} zwischen eine N-terminale ER-Signalsequenz mit einem Reporterprotein fusioniert wurde (Mf 1-37 C_{ub} -Dha). Als Bestandteile der Translokationsmaschinerie wurden die beiden Proteine Sec61p und Sec62p N-terminal mit der Sequenz des N_{ub} verlängert (N_{ub} Sec61p und N_{ub} Sec62p). Bei der Koexpression dieser N_{ub} - und C_{ub} -Fusionsproteine in einer Hefezelle zeigte sich anhand der Freisetzung des Reporterproteins, dass die Interaktion der Sec-Proteine mit dem Translokationssubstrat tatsächlich nachzuweisen ist. N_{ub} und C_{ub} können zum vollständigen Ubiquitin reassoziieren und das Reporterprotein wird von den zytosolischen Ubps abgespalten. Diese Reaktion ist als Nachweis für die transiente Interaktion zwischen Translokationssubstraten und Komponenten der Translokationsmaschinerie spezifisch, was durch zahlreiche Kontrollen, eine Quantifizierung und den Einsatz verschiedener Reportersysteme belegt werden konnte.

Damit konnte eine neue Methode etabliert werden, mit der kurzzeitige Wechselwirkungen von Proteinen in lebenden Zellen nachgewiesen werden können. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass ebenso andere Transportvorgänge wie etwa der Import von Proteinen in die Mitochondrien oder Peroxisomen untersucht werden können, um so die Aufgaben bestimmter Proteine bei verschiedenen Transportvorgängen aufzuklären.

Diese Arbeit zeigt jedoch auch die Probleme auf, die bei der Interpretation der Daten entstehen, die mittels des Split-Ub-Systems gewonnen werden. Wie in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, wird die lokale Konzentration der N_{ub} - und C_{ub} -Fusionsproteine gemessen.

Das heißt, dass zwischen einer räumlichen Nähe und einer direkten Interaktion nicht unterschieden werden kann.

Vergleicht man das Split-Ub-System mit anderen Methoden, die transiente Protein-Interaktionen detektieren können, wie der chemischen Kreuzvernetzung, so wird klar, dass auch diese experimentellen Ansätze nicht die Unterscheidung von Nähe und direkter Interaktion zulassen (z.B. Müsch *et al.*, 1992). Beim Split-Ub-System wird aber im Gegensatz zu den biochemischen Ansätzen in lebenden Zellen gearbeitet. Dies bietet den Vorteil, dass der zu untersuchende biologische Vorgang weitgehend unverändert abläuft.

Ein anderes experimentelles System, mit dem Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* gemessen werden können, ist das Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989). Hier müssen die Fusionsproteine in den Zellkern gelangen, damit ihre Interaktion detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu kann mit dem Split-Ub-System jede Interaktion überall im Zytosol verfolgt werden. Das ermöglicht neben der Messung von Wechselwirkungen zwischen zwei Membranproteinen wie hier gezeigt das Aufspüren transienter Interaktionen, die ausserhalb des Zellkernes stattfinden.

Abschließende Sicherheit bei der Unterscheidung zwischen Proximität und Interaktion ermöglichen wahrscheinlich nur strukturebiologische Arbeitsansätze. Dies stellt sich aber gerade für transiente Interaktionen, wie bei den in dieser Arbeit untersuchten Transportvorgängen, als besonders schwierig dar. Eines der wenigen herausragenden Beispiele, die eine solche kurzlebige Interaktion strukturebiologisch beschreiben, ist eine Arbeit, die die Bindung einer mitochondrialen Signalsequenz an ihren Signalsequenz-Rezeptor untersucht (Abe *et al.*, 2000). Da es sich aber bei der ER-Translokation, um wesentlich größere Proteine oder sogar Protein-Komplexe handelt, gestalten technische Einschränkungen diesen experimentellen Ansatz sehr schwierig.

4.2 Die Abhängigkeit des Modus der ER-Translokation von der Hydrophobizität der Signalsequenz

Ng *et al.* konnten zeigen, dass die Hydrophobizität der Signalsequenzen von Proteinen über die Art entscheiden, wie sie in das ER transloziert werden. Proteine mit hydrophoberen Signalsequenzen gelangen kotranslational unter Beteiligung des SRP in das ER. Proteine mit

weniger hydrophoben Signalsequenzen wählen den posttranslationalen Transportmechanismus, bei dem Sec62p und Sec63p mitwirken.

Für die hydrophoberen Signalsequenzen konnte das SRP als Signalsequenz-Rezeptor identifiziert werden. Das SRP erkennt die Signalsequenz des naszierenden Proteins im Zytosol und leitet somit die Translokation ein.

In Zellen, die Mutationen in den Proteinen Sec62p und Sec63p tragen (die Allele *sec62-1* und *sec63-1*), werden Proteine mit weniger hydrophoben Signalsequenzen nicht effizient transloziert. Ein Fehlen des SRP hingegen führt zu keiner Störung des Transportes dieser Proteine. Welches Protein oder welcher Protein-Komplex ist für die Erkennung der weniger hydrophoben Signalsequenzen verantwortlich? Hierfür kommen mehrere Kandidaten in Frage. Zum einen könnte der ganze heptamere Sec-Komplex an der Signalsequenz-Erkennung beteiligt sein. Diese Aufgabe könnte aber auch dem tetrameren Sec-Komplex alleine zukommen. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass ein einzelnes Protein als Signalsequenz-Rezeptor fungieren kann.

Mit dem Split-Ub-System sollte zunächst getestet werden, ob eine spezifische Interaktion zwischen Translokationssubstraten mit weniger hydrophoben Signalsequenzen und einem Bestandteil des tetrameren Sec-Komplexes, des Sec62p, gemessen werden kann.

Dazu wurden zwei verschiedenen Translokationssubstrate eingesetzt. Das eine trägt die Signalsequenz des α -Faktors (Mf 1-37C_{ub}-Dha), die zu den weniger hydrophoben gerechnet wird. Das andere Translokationssubstrat ist N-terminal mit der Signalsequenz der Invertase (Suc2-23C_{ub}-Dha) versehen. Diese Signalsequenz ist eine der hydrophoberen und sollte die Translokation nach dem kotranslationalen Mechanismus durchlaufen.

N_{ub}Sec62p wurde nun mit den beiden verschiedenen Translokationssubstraten koexprimiert und die Reaktionen miteinander verglichen. Während in der Western-Blot-Analyse nur ein geringer Unterschied in der Interaktion der beiden verschiedenen Translokationssubstrate zu messen ist, wird dieser in den Pulse-Experimente sehr deutlich. Das Translokationssubstrat mit der Signalsequenz des α -Faktors interagiert deutlich stärker mit N_{ub}Sec62p als das Translokationssubstrat mit der Signalsequenz der Invertase. Als Referenz dieser Messung diente das Fusionsprotein N_{ub}Sec61p. Als Translokationskanal sollte Sec61p mit allen Translokationssubstraten gleich stark interagieren können, unabhängig davon, welche Signalsequenzen sie tragen. N_{ub}Sec61p vermag tatsächlich bei der Koexpression mit Mf 1-37C_{ub}-Dha und Suc2-23C_{ub}-Dha ungefähr die gleiche Menge an Reporterprotein freizusetzen.

Beim Einsatz des $N_{ub}Sec61p$ wird ein Problem deutlich, dass bei der Verwendung der N_{ub} - oder C_{ub} -Fusionsproteine im Split-Ub-System auftreten kann. Die N-terminale oder auch die C-terminale Erweiterung kann dazu führen, dass die jeweiligen Proteine nicht mehr vollständig funktionell sind. Im Falle des $N_{ub}Sec61p$ wirkt sich das so aus, dass ein Teil der Translokationssubstrate nicht genauso effizient in das ER transloziert werden wie in Zellen mit unmodifiziertem Sec61p. Schon vorher konnte gezeigt werden, dass Fusionen am N-Terminus des Sec61p zu einer eingeschränkten Funktion während der Translokation führen (Pilon *et al.*, 1998). Es mußte sichergestellt werden, dass das modifizierte Sec61p nicht zu einer zu starken Akkumulation von Translokationssubstraten im Zytosol führt. Diese Aufkonzentration der N_{ub} - und C_{ub} -Fusionsproteine könnte zu einem Signal an abgespaltenem Reporterprotein führen, das keine spezifische Interaktion der beiden getesteten Proteine repräsentiert. Durch den Einsatz des $N_{ug}Sec61p$ konnte aber gezeigt werden, dass diese Fusionsproteine nicht genügend C_{ub} -Translokationssubstrat im Zytosol anreichert, um zu einer nachweisbaren Reassoziierung von N_{ug} und C_{ub} zu führen (Daten nicht gezeigt). Die gemessene Interaktion zwischen $N_{ub}Sec61p$ und den beiden C_{ub} -Translokationssubstraten ist somit spezifisch und kann als Referenz zu den Experimenten mit $N_{ub}Sec62p$ bestehen bleiben. Der Einsatz eines anderen Reporterproteins, des Ura3p, konnte die spezifische Nähe von $N_{ub}Sec62p$ zu Translokationssubstraten mit den Signalsequenzen des Ψ -Faktors im Vergleich zu den Translokationssubstraten mit der Signalsequenz der Invertase bestätigen.

Proteine mit weniger hydrophoben Signalsequenzen werden posttranslational mit Hilfe des tetrameren Sec-Komplexes in das ER transloziert und interagieren deshalb stärker mit Sec62p. Die Studie von Ng *et al.*, in der ein solches Modell der Signalsequenz-Erkennung abgeleitet wurde, stütze sich auf den Anstau von Translokationssubstraten im Zytosol durch Mutanten der Proteine Sec62p, Sec63p und einem Protein des SRP (Ng *et al.*, 1996). Diese Störungen können auch einen indirekten Einfluss der betreffenden Proteine bedeuten. Beispielsweise wäre es möglich, dass Proteine, die an der Translokation der getesteten Translokationssubstrate beteiligt sind, nicht effizient transloziert werden. Das würde bedeuten, dass dadurch der Transport der Translokationssubstrate in das ER gestört verläuft, Sec62p und Sec63p aber nicht direkt an ihrer Translokation teilnehmen. Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wird jedoch eine direkte Beteiligung des Sec62p und damit des ganzen tetrameren Sec-Komplexes wahrscheinlich.

Warum interagiert $N_{ub}Sec62p$ überhaupt noch mit C_{ub} -Translokationssubstraten, die die Signalsequenz der Invertase tragen? Möglicherweise unterscheiden die beiden Translokationswege nicht sehr exakt zwischen den unterschiedlichen Signalsequenzen. Das

heißt, dass auch Proteine mit hydrophoberen Signalsequenzen über den posttranslationalen Translokationsmechanismus in das ER gelangen können. Dies mag zwar seltener vorkommen, aber mit den hier angewandten sensitiven Methoden zu messen sein. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den hydrophoben und den weniger hydrophoberen Signalsequenzen, so ist festzustellen, dass sich deren grundlegende Eigenschaften gleichen. Insgesamt haben die Signalsequenzen aller betrachteten Proteine einen hydrophoben Charakter und bilden als strukturelles Merkmal wahrscheinlich α -Helices aus (Notwehr und Gordon, 1990). Das bedeutet, dass die Rezeptoren, die die jeweiligen Signalsequenzen erkennen, auch eine geringe Affinität zu den Signalsequenzen aufweisen, die den alternativen Transportweg vorziehen. Weiterhin könnte das $N_{ub}Sec62p$ bei der Translokation der C_{ub} -Translokationssubstrate mit der Signalsequenz der Invertase so nahe am Translokon lokalisiert sein, dass es zu einer Reassoziierung von N_{ub} und C_{ub} kommen kann. Schließlich laufen beide Translokationsmechanismen unter der Beteiligung des trimeren Sec-Komplexes ab. Alle Proteine, die an der Translokation in das ER beteiligt sind, halten sich damit möglicherweise in unmittelbarer Nähe voneinander auf und $N_{ub}Sec62p$ kommt auch den C_{ub} -Translokationssubstraten mit der Signalsequenz der Invertase nahe genug, um ein meßbares Signal im Split-Ub-System zu verursachen.

4.3 Die biologische Funktion der posttranslationalen Translokation

Warum gibt es in Hefezellen zwei verschiedene Wege der Signalsequenz-Erkennung? Ist die posttranslationale Translokation nur ein Ersatzmechanismus? Dies scheint fraglich, da die Hauptbestandteile des tetrameren Komplexes, Sec62p und Sec63p, in Hefe essentiell sind (Deshaies und Schekman, 1987; Rothblatt *et al.*, 1989; Feldheim *et al.*, 1992).

Es besteht die Möglichkeit, dass der Mechanismus der posttranslationalen Translokation dazu dient, eine feiner abgestimmte Regulierung dieses Transportweges zu erreichen. Dies könnte beispielsweise in einer räumlichen Auftrennung der verschiedenen Translokationssubstrate schon während ihres Eintrittes in das ER geschehen. Eine Subkompartimentierung des ER konnte in Bezug auf andere biologische Funktionen erkannt werden, beispielsweise die des glatten und rauhen ER (sER bzw. rER). Die räumliche Differenzierung der Aufgaben eines Kompartimentes erleichtert die Aufkonzentration der beteiligten Proteine und ermöglicht eine effizientere Ausführung der aufeinanderfolgenden Reaktionen, die in diesem

Subkompartiment stattfinden. So wäre es denkbar, dass die Proteine, die verantwortlich für die weitere Verarbeitung der translozierten Polypeptide sind, unterschiedlich in den Umgebungen der verschiedenen Sec-Komplexe verteilt vorliegen. Zu den Proteinen, die an der weiteren Reifung der translozierten Proteine beteiligt sind, zählen die Glykosyltransferasen, die Protein-Disulfid-Isomerase, die Signalpeptidase und zahlreiche luminaire molekulare Chaperone (Übersichtsartikel: Taylor *et al.*, 1984; Roulling und Freedman, 1993). Wenn die Translokationssubstrate, die posttranslational transloziert werden, andere Anforderungen an die Ausstattung mit modifizierenden Enzymen stellen als die, die kotranslational in das ER gelangen, könnte durch eine Aufteilung eine schnellere und effizientere Reifung aller betroffenen Proteine gewährleistet werden. Nur sehr sensitive Meßmethoden würden es erlauben, eine solche Verteilung zu detektieren, da der räumliche Abstand der jeweiligen Subkompartimente sehr gering ist. Es liegen schon Studien vor, die die Assoziation der modifizierenden Proteine im ER-Lumen an das Translokation belegen (Kallies *et al.*, 1998). Diese Arbeiten waren aber nicht darauf ausgerichtet, eine etwaige Differenzierung in Bezug auf die verschiedenen Translokationsmaschinerien aufzudecken.

Auch könnten sich in den unterschiedlichen Transportwegen in das ER die abweichenden Anforderungen widerspiegeln, die Proteine an ihre Translokation stellen. Proteine, die sehr effizient transloziert werden müssen, sind mit einer hydrophoberen Signalsequenz ausgestattet. Diese läßt sie kotranslational in das ER gleiten und verhindert ein vorzeitiges Falten oder Aggregieren im Zytosol. Beispiele hierfür stellen polytopische Membranproteine dar. Wenn diese in das Zytosol synthetisiert werden, führt ihr großer Anteil an hydrophoben Transmembrandomänen möglicherweise zur sofortigen Aggregation mit anschließendem Abbau. Proteine, die weniger effizient in das ER transportiert werden müssen, besitzen dieser Hypothese zufolge weniger hydrophobe Signalsequenzen. Ihr Aufenthalt im Zytosol kann nicht dazu führen, dass ihr Transport in das ER unmöglich wird. Sie werden mit Hilfe zytosolischer Faktoren in einem translokationskompetenten Zustand gehalten bis sie ihren Weg durch die ER-Membran antreten. Durch die Hydrophobizität der Signalsequenz wäre also gewährleistet, dass Proteine, deren Translokation kotranslational ablaufen muß, damit sie effizient durch die ER-Membran transportiert werden, sofort zum Translokation gelangen.

4.4 Die Funktion des Sec62p bei der posttranslationalen Translokation

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten molekularen Untersuchungen an Sec62p sollte geklärt werden, welche Aufgabe dieses Protein bei der posttranslationalen Translokation übernimmt. Dazu wurden verschiedene Deletions- und Punktmutanten von Sec62p erstellt und untersucht.

4.4.1 Die funktionellen Domänen des Sec62p

4.4.1.1 Die Sec62p-Deletionsmutanten

Die Deletionsmutanten des Sec62p weisen den C-terminalen Bereich, der hinter der zweiten Transmembrandomäne liegt, als essentiellen Abschnitt des Moleküls aus. Die Mutante Sec62(C60)Dha, der dieser Abschnitt fehlt, ist nicht funktionell. Die Translokationsexperimente mit Hilfe des Split-Ub-System zeigten darüber hinaus, dass alle Veränderungen am C-Terminus des Sec62p die Nachbarschaft zum Translokationssubstrat reduzieren. Dies gilt sowohl für die C-terminale Fusion des Dha, als auch für die C-terminalen Deletionen. Die Mutanten $N_{ub}Sec62(C35)Dha$, $N_{ub}Sec62(C60)Dha$ und $N_{ub}Sec62(C125)Dha$ können nur noch in äußerst geringem Maße mit $Mf\ 1-37C_{ub}-Dha$ interagieren. $N_{ub}Sec62(N107)Dha$, dem die N-terminale zytosolische Domäne fehlt, interagiert mit dem Translokationssubstrat fast so gut wie das $N_{ub}Sec62Dha$. Zusätzlich zu den Daten, die mit Hilfe des Split-Ub-Systems gewonnen wurden, wurde die Translokation des CPY in Hefestämmen betrachtet, die verschiedene Sec62p-Deletionsmutanten als einzige Versionen des Sec62p exprimieren. Das Fehlen verschieden langer Abschnitte am C-Terminus des Sec62p führt dazu, dass die Translokation des CPY beeinträchtigt ist. Vor allem in Zellen, die Sec62(C35)Dha exprimieren, reicherte sich die Vorläuferform des Proteins im Zytosol an. Allerdings führt hier auch die N-terminale Deletion am Sec62p zu einer verminderten CPY-Translokation.

Aus diesen Beobachtung folgt, dass der C-terminale Abschnitt, der hinter der zweiten Transmembrandomäne beginnt, wichtig für die Funktion des Sec62p bei der Translokation ist. Zwei unterschiedliche Erklärungen bieten sich hierfür an. Der C-terminale Abschnitt ist an der Wechselwirkung mit dem Translokationssubstrat direkt beteiligt oder der C-terminale Abschnitt des Sec62p ist bei der Bildung des Sec-Komplexes involviert. Gleichzeitig zu den

hier vorgestellten Untersuchungen wurden die Deletionsmutanten auch auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit Sec63p und Sec61p zu interagieren (Wittke *et al.*, 2000). Dabei wurde gefunden, dass Sec62(N107)Dha schlechter mit dem Sec-Komplex interagiert als Sec62(C60)Dha. Es liegt daher nahe, dass der C-terminale Abschnitt des Sec62p nicht an der Interaktion mit den anderen Proteinen des Sec-Komplexes beteiligt ist, sondern vor allem für die direkte Wechselwirkung mit dem Translokationssubstrat verantwortlich ist.

4.3.1.2 Der C-terminale Abschnitt des Sec62p

Die Resultate, die mit Hilfe der Deletionsmutanten des Sec62p gewonnen wurden, lassen nur in eingeschränktem Maße Aussagen über die deletierten Bereiche des Proteins zu. Deshalb wurde versucht, den essentiellen C-terminalen Teil isoliert zu exprimieren und zu charakterisieren. Dabei war überraschend, dass die Fusionsproteine Sec62(N206)_{C_{ub}}-Dha und Sec62(N218)_{C_{ub}}-Dha, die nur den Teil des Proteins C-terminal der zweiten Transmembrandomäne darstellen, funktionelle Versionen des Sec62p sind. Von Interesse war nun, ob dieser Abschnitt noch mit einem Translokationssubstrat interagieren kann. Nub-Fusionsproteine der Deletionsmutanten wurde mit dem Translokationssubstrat koexprimiert. Im Split-Ub-System konnte keine spezifische Wechselwirkung dieser Deletionsmutanten mit dem Translokationssubstrat nachgewiesen werden. Die Interpretation dieses Experimentes wird durch die Tatsache erschwert, dass die eingesetzten N_{ub}-Fusionsproteine der Deletionsmutanten überraschenderweise nicht funktionell sind. Eine Aussage über die Fähigkeit des C-terminalen Abschnittes des Sec62p direkt mit Translokationssubstraten interagieren zu können, ist somit mit der Split-Ub-Methode nicht möglich.

Die Frage, ob sich die Fusionsproteine, die nur noch den C-terminalen Teil des Sec62p enthalten, noch im Sec-Komplex aufhalten, konnte sowohl durch die differentielle Zentrifugation, durch die Ko-Immunopräzipitation, wie auch durch die Experimente mit Hilfe des Split-Ub-Systems nicht eindeutig geklärt werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse stellen bestenfalls Hinweise auf eine Lokalisation des C-terminalen Abschnittes des Sec62p im Sec-Komplex dar. Wahrscheinlich bieten nur biochemische Experimente die Möglichkeit, die Funktionen des C-terminalen Abschnittes des Sec62p zu klären. Auf diese Weise könnte beispielsweise eine direkte Interaktion von Translokationssubstrat und dieser Domäne des Proteins nachgewiesen werden.

4.4.1.3 Die Punktmutanten des Sec62p

Die Einführung von Punktmutanten im konservierten C-terminalen Abschnitt des Sec62p sollte einen weiteren Einblick in die Funktion dieses Abschnittes des Proteins gewährleisten. Zunächst wurde dabei die Rolle des konservierten Arginins an der Aminosäureposition 207 des Sec62p betrachtet. Die beiden Mutanten Sec62(R207K) und Sec62(R207Q)p sind funktionelle Proteine und Zellen mit diesen Proteinen als einzigen Versionen des Sec62p unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten nicht von Wildtyp-Zellen. In der Interaktion mit dem Translokationssubstrat Mf 1-37C_{ub}-Dha zeigte sich für N_{ub}Sec62(R207Q)p eine verminderte Interaktion. N_{ub}Sec62(R207K)p kann ungefähr genauso gut mit Mf 1-37C_{ub}-Dha interagieren wie N_{ub}Sec62p. Das Arginin an Position 207 des Sec62p scheint also bei diesen Funktionen keine wichtige Rolle zu spielen. Im Rückblick ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da eine Version des C-terminalen Abschnittes des Sec62p (Sec62(N218)C_{ub}-Dha) ohne diese konservierte Aminosäure noch immer funktionell ist. Allerdings ist festzustellen, dass in Zellen, in denen Sec62(R207K)p bzw. Sec62(R207Q)p als einzige Versionen des Sec62p exprimiert werden, die Translokation des CPY gestört ist. Die Interaktion des Sec62p mit dem Sec63p wurde durch die Mutationen in den hier vorgenommenen Experimenten nicht beeinflusst.

Die Funktion des hochkonservierten Abschnittes von Aminosäureposition 227 bis 233 sollte durch Mutagenese der konservierten Aminosäuren in Alaninreste weiter aufgeklärt werden. Unglücklicherweise führt der größte Teil der Mutationen zu instabilen Proteinen, die keinerlei weitere Untersuchungen erlauben. Die stabilen Mutationen verhalten sich aber in allen präsentierten Experimenten wie das unmodifizierte Sec62p. Somit konnte kein besseres Verständnis der Funktion des konservierten Abschnittes des Sec62p gewonnen werden.

4.4.2 Ist Sec62p ein Rezeptor für ER-Signalsequenzen?

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Protein Sec62p lassen einige Spekulationen über dessen Funktion bei der Translokation von Proteinen in das ER zu. Diese weichen von der bisher publizierten Hypothese ab, die dem Sec62p lediglich eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des Sec-Komplexes zuschreibt (Plath *et al.*, 1998; Übersichtsartikel: Rapoport *et al.*, 1999).

Sec62p könnte an der Erkennung der weniger hydrophoben Signalsequenzen bei der posttranslationalen Translokation direkt beteiligt sein. Als ein Rezeptor würde das Protein im tetrameren Sec-Komplex die Signalsequenzen der Translokationssubstrate im Zytosol erkennen. Dadurch könnte die Assoziation des tetrameren Sec-Komplexes mit dem trimeren Sec-Komplex induziert werden, was zur Bildung des heptameren Sec-Komplexes führt. Dieser Protein-Komplex transportiert die Proteine in das Lumen des ER (Abb. 4.1 A).

Es ist aber auch möglich, dass das Sec62p als ein Korezeptor in Verbindung mit Sec61p fungiert. Einige Eigenschaften des Sec61p führten zu der Annahme, dass Sec61p neben der Funktion als Kanal in der ER-Membran auch als Signalsequenz-Rezeptor agiert (Jungnickel und Rapoport, 1995; Kommentar dazu: Siegel, 1995). Sec61p und Sec62p erkennen wohlmöglich als Bestandteil des heptameren Sec-Komplexes gemeinsam die Signalsequenzen und die Translokation der Protein erfolgt gleich im Anschluß (Abb. 4.1B).

Nur eingehende biochemische Untersuchungen können diese Arbeitshypothesen überprüfen, denn durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können sie nicht eindeutig belegt werden. Allerdings sollten beispielsweise durch die Charakterisierung des C-terminalen Teiles des Sec62p, der wahrscheinlich für die Signalsequenz-Erkennung ausreichend ist, die nachfolgenden Arbeiten erleichtert werden. Durch Techniken wie etwa die Plasmon-Resonanz (Übersichtsartikel: Green *et al.*, 2000; Mendelsohn und Brent, 1999) könnte es gelingen, die direkte Interaktion einer Signalsequenz mit einer Domäne des Sec62p nachzuweisen. Auch bietet die reduzierte Größe des C-terminalen Teiles des Sec62p, der bei der Signalsequenz-Erkennung eventuell die dominante Rolle spielt, im Vergleich zum ganzen Protein, die Chance mit strukturebiologischen Methoden einen Komplex aus Signalsequenz und der Sec62p-Domäne dreidimensional darzustellen.

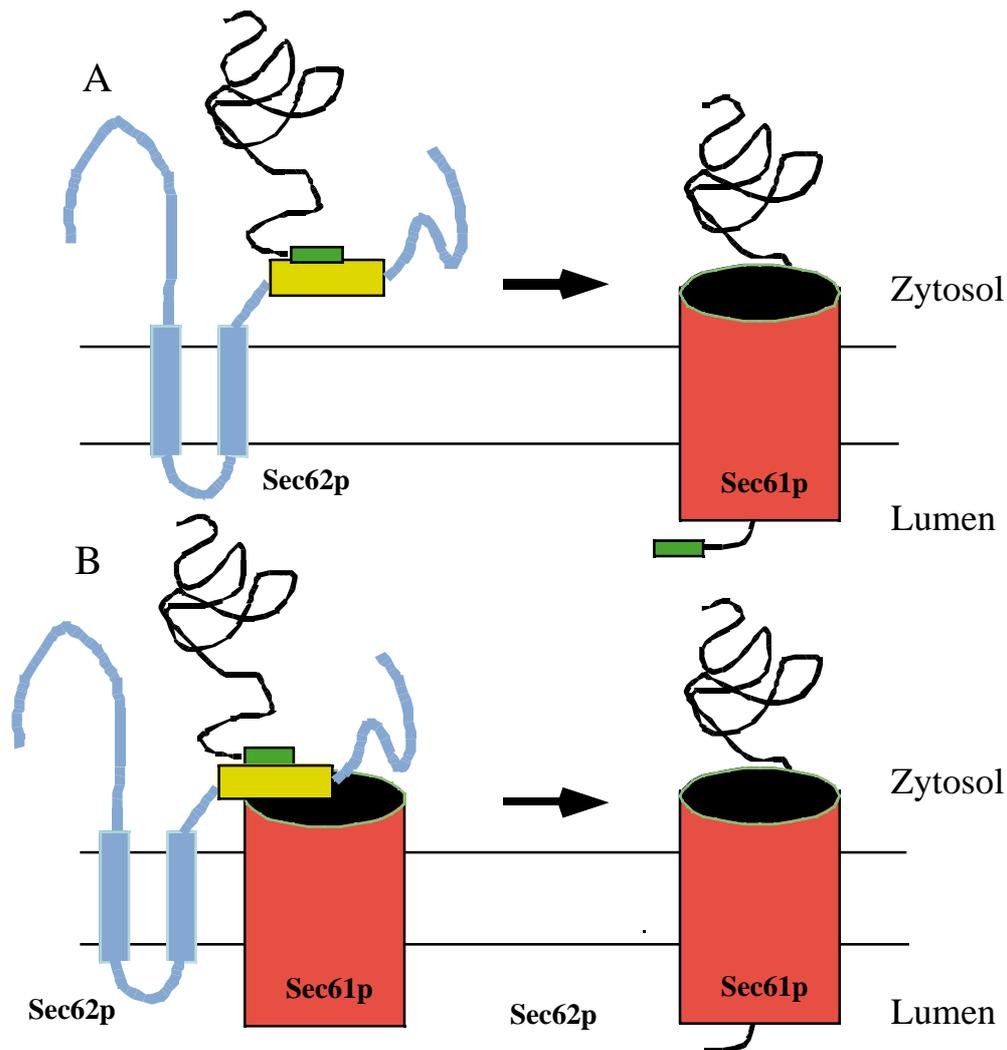


Abb. 4.1 Die beiden Hypothesen zur Funktion des Sec62p als Signalsequenz-Rezeptor. A Sec62p fungiert alleine als Signalsequenz-Rezeptor. Das Translokationssubstrat (schwarz) bindet mit seiner Signalsequenz (grünes Rechteck) an die C-terminale Domäne des Sec62p (gelbes Rechteck). Von dort aus wird es zum Sec61p transportiert und in das Lumen des ER transportiert. **B** Sec62p und Sec61p erkennen gemeinsam die Signalsequenz. Gleich nach der Bindung wird das Translokationssubstrat vom Sec61p-Komplex in das Lumen des ER transportiert.

4.5 Der Ssh1p-Komplex

In dieser Arbeit wurde neben der Funktion des Sec62p die des alternativen Sec-Komplexes der Hefe, des Ssh1p-Komplexes, untersucht. Dabei konnte mittels des Split-Ub-Systems eine Interaktion zwischen $N_{ub}Ssh1p$ und C_{ub} -Translokationssubstraten aufgezeigt werden. $N_{ub}Ssh1p$ kommt vorzugsweise dem C_{ub} -Translokationssubstrat mit der Signalsequenz der Invertase (Suc2-23 C_{ub} -Dha) nahe, während keine Interaktion mit C_{ub} -

Translokationssubstraten mit anderen Signalsequenzen nachzuweisen ist (Mf 1-37C_{ub}-Dha und Prc1-35C_{ub}-Dha). Diese C_{ub}-Translokationssubstrate interagieren mit N_{ub}Sec61p in etwa gleicher Weise. Ähnlich wie bei Sec62p kann also von einer Präferenz des Ssh1p für Translokationssubstrate mit bestimmten Signalsequenzen gesprochen werden.

Diese Interaktion könnte auf eine Rolle des Ssh1p-Komplexes beispielsweise als eine Art alternatives Translokon beim ER-Transport bestimmter Proteine in das ER hinweisen.

Die Interaktion zwischen N_{ub}Sbh2p und dem C_{ub}-Translokationssubstrat mit der Signalsequenz der Invertase ist dagegen weniger eindeutig. Wie schon gezeigt (Finke *et al.* 1996) hat Sbh2p eine geringe Affinität zum trimeren Sec-Komplex. Bei der Überexpression des N_{ub}Sbh2 in den hier durchgeführten Experimenten könnte es dazu gekommen sein, dass viele N_{ub}Sbh2p Moleküle im trimeren Komplex mit Sec61p kolokalisiert sind und deshalb auch mit C_{ub}-Translokationssubstraten mit der Signalsequenz des -Faktors interagieren können.

Mit dem Ub-System sollte hier aufgedeckt werden, ob ein Translokationsdefekt in Zellen vorliegt, denen Ssh1p fehlt. Ein Anstau der Translokationssubstrate in Zellen ohne Ssh1p konnte allerdings nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden. Einerseits liegt es möglicherweise am experimentellen System. Da bei allen verwendeten Fusionsproteinen bereits in Wildtyp-Zellen ein sehr großer Teil des Reporterproteins (Dha) abgespalten wird, ist die Messung einer Zunahme dieses Signals sehr schwierig. Die kompakte Struktur des Ub in den Translokationssubstraten könnte dazu führen, dass sie nicht effizient genug in das ER transportiert werden. Ub nimmt während der Synthese der Translokationssubstrate bereits seine native Struktur an und kann damit nicht mehr problemlos durch das Translokon in das ER-Lumen transportiert werden. Eine Lösung für dieses Problem könnte darin bestehen, die Stabilität des Ub herabzusetzen oder seine Faltung zu verlangsamen, so dass die Translokation in das ER reibungslos vollzogen werden kann. Die Einführung von Aminosäureaustauschen, wie etwa bei den Mutanten des N_{ub} im Split-Ub-System (N_{ua} und N_{ug}), stellt eine Möglichkeit dazu dar.

Die Probleme bei der Untersuchung der Translokation mit dem Ub-System können ihre Ursache im Mechanismus dieses Proteintransportweges haben. Nur wenn ein Translokationsdefekt dazu führt, dass die Translokationssubstrate im Zytosol akkumulieren wie zum Beispiel bei Mutationen im SRP (Mason *et al.*, 2000) und sie dann dem Zugriff der Ubps zur Verfügung stehen, wäre dies mit dem Ub-System zu messen. Bei der Deletion des Ssh1p ist dies bestenfalls in äußerst geringem Maße der Fall.

Mit einer traditionellen Methode, Translokationsdefekte zu untersuchen, konnte wie auch schon an anderer Stelle beschrieben, keine Störung in Hefezellen ohne Ssh1p nachgewiesen werden.

4.5.1 Die Funktion des Ssh1p-Komplexes

Warum gibt es in Hefe einen alternativen Sec-Komplex? Festzustellen ist, dass der Komplex in die unmittelbare Nähe von Translokationssubstraten mit der Signalsequenz der Invertase kommt. Ob diese Proximität eine direkte Rolle des Ssh1p bei der Translokation widerspiegelt, ist ungewiß. Bei der Betrachtung der Sequenz des Ssh1p, könnte angenommen werden, dass es sich bei diesem Protein um einen alternativen Kanal in der ER-Membran handelt. Bei gleicher Topologie und Struktur von Ssh1p und Sec61p liegt nahe, dass die beiden Proteine auch ähnliche Funktionen ausführen. Es konnten aber im Vergleich zu Sec61p nur sehr geringe Mengen des Ssh1p an Ribosomen gebunden nachgewiesen werden (Finke *et al.*, 1996; Prinz *et al.* 2000), was eine Rolle bei der kotranslationalen Translokation nahelegt, aber eine andere Funktion des Ssh1p als die des Sec61p implizieren kann.. Die Assoziation der Ribosomen an die Translokationspore Sec61p ist nämlich ein Charakteristikum dieses Proteines in seiner Funktion während der Translokation. Möglicherweise dient das Ssh1p als eine Art zusätzlicher Rezeptor für sehr hydrophobe Signalsequenzen, wie die der Invertase. Da im ER der Hefe ein großer Teil der Proteine des trimeren Sec-Komplexes im heptameren Sec-Komplex vorliegen, stehen diese nicht der kotranslationalen Translokation zur Verfügung. Ssh1p erkennt eventuell die Signalsequenzen von Proteinen, die kotranslational transloziert werden, für die aber kein freier trimerer Sec-Komplex mehr zur Verfügung steht. Die Proteine werden dann über den Ssh1p-Komplex zur Translokation in das Lumen des ER geleitet.

Ein anderer Wirkmechanismus des Ssh1p-Komplexes könnte eine unterstützende Funktion bei der Translokation von bestimmten Proteinen, etwa Transmembranproteinen sein. So wäre denkbar, dass Ssh1p zusätzlich oder abwechselnd mit dem trimeren Sec-Komplex bei der Topogenese von sehr großen Transmembranproteinen wirkt. Die Transmembrandomänen dieser Proteine sind den hydrophoberen Signalsequenzen, wie der der Invertase, ähnlich.

Um die Funktion des Ssh1p-Komplexes besser zu verstehen, bedarf es noch weiterer Experimente. Eine Möglichkeit bietet die chemische Kreuzvernetzung, um die Beteiligung des Ssh1p an der Translokation bestimmter Proteine zu belegen. Biophysikalische

Untersuchungen wie am Sec61-Komplex (Crowley *et al.*, 1993; Crowley *et al.* 1994) bieten weiterhin die Möglichkeit, Gewißheit darüber zu gelangen, ob es sich beim Ssh1p-Komplex um einen alternativen Kanal in der ER-Membran handelt. Durch die Suche nach Mutanten, die in Verbindung mit der Deletion des Ssh1p zu einem lethalen Phenotyp der betroffenen Hefezellen führen, könnte darüber hinaus die Funktion dieses alternativen Sec-Komplexes der Hefe geklärt werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Split-Ub-System genutzt, um die transiente Interaktion zwischen Translokationssubstraten und Bestandteilen der Translokationsmaschinerie während des Transportes in das ER in lebenden Hefezellen zu messen. Dazu wurden die Proteine Sec61p und Sec62p N-terminal mit N_{ub} , dem N-terminalen Teil des Ubiquitins fusioniert. Als Translokationssubstrat fungierte ein Fusionsprotein bestehend aus einer N-terminalen Signalsequenz, dem C-terminalen Teil des Ubiquitin (C_{ub}), und einem Reporterprotein. Bei der Interaktion der N_{ub} - und C_{ub} -Fusionsproteine kommt es zur Reassoziierung zum vollständigen Ubiquitin. Die Ubiquitin-spezifischen Proteasen spalten das Reporterprotein hinter dem C_{ub} ab. Die Effizienz dieser Reaktion dient als Maß der Nachbarschaft zwischen den Sec-Proteinen und dem Translokationssubstrat.

Es gibt zwei verschiedene Mechanismen, durch die Proteine über die Membran in das Lumen des ER gelangen können: die kotranslationale und die posttranslationale Translokation. Mit dem hier verwendeten experimentellen Ansatz gelang es zu bestätigen, dass die Eigenschaften der Signalsequenz festlegen, auf welchem Weg ein Protein über die ER-Membran transloziert wird. Sec62p ist ein Bestandteil des tetrameren Sec-Komplexes. Dieser ist für die posttranslationale Translokation verantwortlich. Im Split-Ub-System interagiert Sec62p bevorzugt mit Translokationssubstraten, die die Signalsequenz des α -Faktors, ein Paarungshormon der Hefe, tragen. Die Signalsequenz des α -Faktors gehört zu den weniger hydrophoben Signalsequenzen, während die der Invertase einen stark hydrophoben Charakter hat. Translokationssubstrate mit dieser Signalsequenz können in Split-Ub-System nur in eingeschränktem Maße mit Sec62p interagieren.

Mit Hilfe dieses Meßverfahrens wurde anschließend eine funktionelle Charakterisierung des Sec62p vorgenommen. Mutagenese-Studien an Sec62p sollten helfen, die Funktion des Sec62p besser zu verstehen. Es konnte gezeigt werden, dass der für die Funktion des Sec62p essentielle Bereich auf nur 43 Aminosäuren beschränkt ist. Dieser Abschnitt besitzt keine Transmembrandomänen und liegt im C-terminalen Bereich des Proteins.

Durch verschiedene experimentelle Ansätze wurde darüber hinaus versucht, die Funktion eines alternativen Sec-Komplexes in Hefe, des Ssh1p-Komplexes, aufzudecken. Mit dem Split-Ub-System konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein N_{ub} Ssh1p bevorzugt mit einem C_{ub} -

Translokationssubstrat, das die Signalsequenz der Invertase trägt, interagiert. Translokationssubstrate mit den anderen getesteten Signalsequenzen zeigten keine spezifische Nähe zu Ssh1p. Dies macht wahrscheinlich, dass Ssh1p an der ER-Translokation nur einer Auswahl von Proteinen beteiligt ist.

6 Literaturverzeichnis

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torri H., Nishikawa, S. Endo, T. und Kohda, D. (2000). Structural basis of the presequence recognition by the mitochondrial import receptor TOM 22. *Cell* 100(5), 551-560

Achstetter, T. und Wolf, D.H. (1985). Hormone processing and membrane-bound proteinases in yeast. *EMBO J.* 4, 173-177

Alber, T. und Kawasaki, G. (1982). Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 419-434

Bachmair, A., Finley, D. und Varshavsky, A. (1986). In vivo half life of a protein is a function of its amino terminal residue. *Science* 234, 179-186

Baker, R.T., Tobias, J.W. und Varshavsky A. (1992). Ubiquitin specific protease of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning and functional analysis of the UBP gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 23364-23375

Banfield, D.K., Levis, M.J., Rabouille C., Warren G. und Pelham H.R. (1994). Localization of the Sed5, a putative vesicle targeting molecule, to the cis-Golgi network involves both its transmembrane and cytoplasmic domains. *J. Cell. Biol.* 127, 357-371

Beckmann, R., Bubek, D., Grassucci R, Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. und Frank, J. (1997). Alignment of conduits of the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278, 2123-2126

Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1496-1500

- Bradford, M.M. (1979). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brodsky, J.L. und Schekman, R. (1993). A Sec63-Bip complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J. Cell Biol.* 123 (6Pt1), 1255-1363
- Brodsky, J.L. (1998). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int. Rev. Cytol.* 178, 277-328
- Brodsky, J.L. und McCracken A.A. (1999). ER protein quality control and proteasome mediated protein degradation. *Sem. Dev. Cell Biol.* 10, 507-513
- Brown, J.D., Hann, B.C., Medzihradsky, K.F., Niva, M., Burlingame, A.L. und Walter, P. (1994). Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J.* 13, 4390-4400
- Chuck, S.L. und Lingappa, V.R. (1992). Pause transfer: a topogenic sequence in apolipoprotein B mediates stopping and restarting of translocation. *Cell* 68, 9-21
- Clemons W.M. Jr., Gowda, K., Black, S.D., Zwieb, C. und Ramakrishnan, V. (1999). Crystal structure of the conserved subdomain of human SRP 54M at 2,1 Å resolution: evidence for the mechanism of signal peptide binding. *J. Mol. Biol.* 292, 697-705
- Connolly T., Rapiejko, P.J. und Gilmore, R. (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* 252, 1171-1173
- Connolly, T. und Gilmore, R. (1993). GTP hydrolysis by complex of the signal recognition particle and the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* 123, 799-807

- Corsi, A.K. und Schekman, R. (1997). The luminal domain of Sec63p stimulates ATPase activity of Bip and mediates Bip recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 137, 1483-1493
- Crowley, K.S., Reinhart, G.D. und Johnson, A.E. (1993). The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the endoplasmic reticulum membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101-1115
- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D. und Johnson, A.E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, 461-471
- Cyr, D.M., Langer, T. und Douglas M.G. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* 19, 176-181
- Daimon, M., Susa, S., Suzuki, K., Kato, T., Yamatani, K. und Sasaki, H. (1997) Identification of the human cDNA homologue to the *Drosophila* translocation protein 1 (Dtrp1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 100-104
- Deshaies, R.S., und Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 105, 633-65
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. und Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805
- Deshaies, R.J. und Schekman R. (1989). *SEC62* encodes a putative membrane protein required for protein translocation into yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 199(6Pt1) 2653-2669

- Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1990). Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol. Cell Biol.* 10, 6024-6035
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. und Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808
- Dev, I.K. und Ray, P.H. (1990). Signal peptidases and signal peptide hydrolases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22, 271-290
- Esnault, Y., Blondel, M.O., Deshaies, R.J., Schekman, R. und Kepes, F. (1993). The yeast *SSS1* gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 12, 4083-4093
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M.O., Schekman, R. und Kepes, F. (1994). *SSS1* encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J. Biol. Chem.* 269, 27478-27485
- Fang, H. und Green, N. (1994). Nonlethal *sec71-1* and *sec72-1* mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-Bip complex from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 5, 933-942
- Feldheim, D., Rothblatt, J. und Schekman, R. (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell Biol.* 12, 3288-3296
- Feldheim, D. und Schekman, R. (1994). Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J. Cell Biol.* 126, 935-943
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246

Finke, K., Plath, K., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E. und Sommer T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 15, 1482-1494

Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone Bip. *Sem. Cell Biol.* 10, 465-472

Gietz, D., te Heesen, S., Graham, T.R., Aebi, M. und Emr, S.D. (1996). Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi into the ER in yeast. *J. Cell Biol.* 127, 653-665

Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P. (1982) a). Protein translocation across the endoplasmic reticulum I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal sequence recognition particle. *J. Cell Biol.* 95(2Pt1), 463-469

Gilmore, R., Walter, P. und Blobel, G. (1982) b). Protein translocation across the endoplasmic reticulum II. Isolation and characterization of the signal sequence particle receptor. *J. Cell Biol.* 95(2Pt1), 470-477

Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U. und Rapoport, T.A. (1992). A mammalian homolog of Sec62p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71, 489-503

Green, N., Fang, H. und Walter, P. (1992). Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 116, 597-604

Green, R.J., Frazier, R.A., Shakeshaeff, K.M., Davies, M.C., Roberts, C.I. und Tendler, S.J. (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* 21, 1823-1835

- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. und Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87, 721-732
- Hann, B. c. und Walter, P. (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* 67, 131-144
- Hann, B.C., Stirling, C.J. und Walter, P. (1992). SEC65 gene product is a subunit of the signal recognition particle required for its integrity. *Nature* 356, 532-533
- Harter, C. und Reinhard, C. (2000). The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell. Biochem.* 34, 1-38
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T.A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367, 654-657
- von Heijne, G. (1990) a). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115, 195-201
- von Heijne, G. (1990) b). Protein targeting signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 604-608
- Hinnen, A., Hicks, J.B. und Fink, G.R. (1978). Transformation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1929-1933
- Hong, W. und Tang, B.L. (1993). Protein trafficking along the exocytic pathway. *Bioessays* 15, 231-238
- Jentsch, S. und Schlenker, S. (1995). Selective protein degradation : a journey' s end within the proteasome. *Cell* 82, 881-884
- Johnson, A.E. und van Waes, M.A. (1995). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 799-842

- Johnson, E.S., Bartel, B., Seufert W. und Varshavsky A. (1992). Ubiquitin as a degradation signal. *EMBO J.* 11,497-505
- Johnson, L.M., Bankaitis, V.A. und Emr, S.D. (1987). Distinct sequence determinants direct intracellular sorting and modification of yeast vacuolar protease. *Cell* 48, 875-885
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994) a). Split-ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Acad. Sci. USA* 91, 10340-10344
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994) b). Ubiquitin assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO J.* 13, 2686-2699
- Jungnickel, B. und Rapoport, T.A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82, 261-270
- Kalies, K.U., Rapoport, T.A. und Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal sequence peptidase during translocation. *J. Cell Biol.* 141, 887-894
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-685
- Lyman, S.K. und Schekman, R. (1995). Interaction between Bip and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131, 1163-1171
- Lyman, S.K. und Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by Bip. *Cell* 88, 85-96
- Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. und Meijer, M. (1992). *MPII*, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J.* 11, 3619-3628

Mason, N., Ciuffo, L.F. und Brown, J.D. (2000). Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO J.* 19, 4164-4174

Matlack, K.E., Mothes, W., und Rapoport, T.A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* 277, 938-941

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

Mendelsohn, A.R. und Brent, R. (1999). Protein interaction methods - toward an endgame. *Science* 284, 1948-1950

Meyer, H.A., Grau, H., Kraft, R. Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.U. und Hartmann, E. (2000). Mammalian Sec61p is associated with Sec62 and Sec63. *J. Biol. Chem.* 275, 14550-14557

Michaelis, S. (1993). STE6, the yeast alpha factor transporter. (1993). *Semin. Cell Biol.* 4, 17-27

Misselwitz, B., Staack, O., Matlack, K.E. und Rapoport, T.A. (1999). Interaction of Bip with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* 274, 20110-20115

Mothes, W., Prehn S. und Rapoport, T.A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* 13, 3973-3982

Mortoglio, B. und Dobberstein, B. (1995). Protein insertion into the membrane of the endoplasmic reticulum: the architecture of the translocation site. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60, 41-45

Müsch, A. Wiedmann, M. und Rapoport, T.A. (1992). Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69, 343-352

Nakahara, D.H., Lingappa, V.R. und Chuck, S.L. (1994). Translocational pausing is a common step in the biogenesis of unconventional integral membrane and secretory proteins. *J. Biol. Chem.* 11, 269, 7617-7622

Nakai, K. (2000). Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. *Adv. Protein Chem.* 54, 277-344

Newman, A.P., Groesch, M.E. und Ferro-Novick, S. (1992). Bos1p, a membrane protein required for ER to Golgi transport in yeast, co-purifies with the carrier vesicles and with Bet1p and the ER membrane. *EMBO J.* 11, 3609-3617

Ng, D.T., Brown, J.D. und Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 134, 269-278

Noel, P. und Cartwright, I.L. (1994). An Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J.* 13, 5253-5261

Notwehr, S.F., und Gordon, S.L. (1990). Targeting proteins into the eukaryotic secretory pathway: signal peptide structure/function relationships. *Bioessays* 12, 479-484

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

Özkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J. und Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* 6, 1429-1439

- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T.A. (1995).
Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of
Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81, 561-570
- Pelham, H.R. (1989). Control of protein exit from endoplasmic reticulum. *Annu. Rev.
Cell Biol.* 5, 1-23
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D. und Schekm, R. (1998). Sec61p serves multiple
roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum
membrane. *Mol. Biol. Cell* 9, 3455-3473
- Plath, K., Mothes, W. Wilkinson, B.M., Stirling, C.J. und Rapoport, T.A. (1998).
Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER
membrane. *Cell* 94, 795-807
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T.A., Hartmann, E. und Kalies, K.-U. (2000).
Evolutionary conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the
large ribosomal RNA. *EMBO J.* 19, 1900-1906
- Romano, J.D., Schmidt, W.K. und Michaelis, S. (1998). The *Saccharomyces
cerevisiae* prenylcysteine carboxyl methyltransferase Ste14p is an the endoplasmic
reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* 9, 2231-2247
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B. und Ktay, U. (1996). Preprotein transport across the
eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev.
Biochem.* 65, 271-303
- Rapoport, T.A., Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B. und Staeck, O. (1999)
Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic
reticulum. *Biol. Chem.* 380, 1143-1150

- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G. und Schekman R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 109(6Pt1), 2641-2652
- Rowling, P.J. und Freedman, R.B. (1993). Folding, assembly and posttranslational modification of proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Subcell. Biochem.* 21, 41-80
- Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T. und Adesnik, M. (1982). Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* 92, 1-22
- Schatz, G. (1986). Protein translocation: a common mechanism for different membrane systems. *Nature* 321, 108-109
- Scidmore, M.A., Okamura, H.H. und Rose, M.D. (1993). Genetic interactions between *KAR2* and *SEC63*, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 4, 1145-1159
- Siegel, V. (1995). A second recognition event required for translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 82, 167-170
- Simon, S.M. und Blobel, G. (1991). A protein conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65, 371-380
- Simon, S.M. und Blobel, G. (1993). Mechanisms of translocation of proteins across membranes. *Subcell. Biochem.* 21, 1-15
- Swennen, D., Joyet, P. und Gaillardin, C. (1997). Cloning the *Yarrowia lipolytica* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* *SEC62* gene. *Curr. Gent.* 31, 128-132
- Stagljar, I., Krostensky, C. Johnsson, N. und te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5287-5192

Taylor, J.A., Foreman, R.C. und Judah, J.D. (1984). Processing of secretory proteins. *Biochem Soc. Trans.* 12, 974-976

Tobias, J.W. und Varshavsky, A. (1991). Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene *UBP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 12021-12028

Tyedmers, S., Lerner, N., Bies, C., Dudek, J., Skowronek M.H., Haas, I.G., Heim, N., Nostainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7214-7219

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E. und Cook, W.J. (1987) Structure of ubiquitin refined at a 1,8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 194, 531-544

Walter, P., Ibrahimi, I. und Blobel, G. (1981) a). Translocation of proteins across the endoplasmic reitculum I. Signal recognition protein (SRP) bind to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91(2Pt1), 545-550

Walter, P. und Blobel, G. (1981) b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesiting secretory protein. *J. Cell Biol.* 91(2Pt1), 551-556

Walter, P und Blobel, G. (1981) c). Translocation of proteins across endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-depending and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* 91(2Pt1), 557-561

Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Bielka, H. und Rapoport, T.A. (1987). Direct probing of the interaction between signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. *J. Cell Biol.* 104, 201-208

Wiedmann, M. Kurzchalia, T.V., Hartmann, E. und Rapoport, T.A. (1987). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature* 328, 830-833

Wilkinson, B.M., Critchley, A.J. und Stirling, C.J. (1996). Determination of the transmembrane topology of the yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J. Biol. Chem.* 271, 25590-25597

Wittke, S., Lewke, N., Müller, S. und Johnsson, N. (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol. Biol. Cell* 10, 2519-2530

Wittke, S., Dünwald, M. und Johnsson, N. (2000).

Ziman, M. Preuss, D., Mulholand, I., O'Brian, J.M., Bostein, D. und Johnson D.J. (1993). Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in control of cell polarity. *Mol. Biol. Cell* 4(12), 1307-1316

Zimmerman, R. (1998). The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* 379(3), 275-282

Zopf, D., Bernstein, H.B., Johnson, A.E. und Walter, P. (1990). The methionine-rich domain of the 54 KD protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to signal sequence. *EMBO J.* 9, 4511-4517

Danksagung

Dr. Nils Johnsson danke ich für die Vergabe des Themas dieser Arbeit, die Unterstützung und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Frau Prof. Dr. S. Korsching danke ich für die Bereitschaft, die Begutachtung zu übernehmen.

Meinen Kollegen danke ich für die gute Atmosphäre im Labor und für die Hilfe, die sie mir zukommen ließen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnungen sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Priv. Doz. Dr. Nils Johnsson betreut worden.

Teilpublikationen:

Dünnwald, M., Varshavsky, A., Johnsson, N. (1998) Detection of Transient In Vivo Interactions between Substrate and Transporter during Protein Translocation into the Endoplasmic Reticulum
Mol. Biol. Cell, Vol. 10, 329-344

Wittke, S., Dünnwald, M., Johnsson, N. (2000) Sec62p, a Component of the ER protein Translocation Machinery, Contains Multiple Binding Sites for the Sec-Complex
Mol. Biol. Cell, Vol. 11

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Dünnwald
Geburtsdatum	19.10.1970
Geburtsort	Leverkusen
Eltern	Christel Dünnwald, geb. Klatt und Erich Dünnwald
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1977-1981	Grundschule Peter-Grieß-Straße, Köln
1981-1990	Genoveva-Gymnasium, Köln; Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1991-1996	Studium der Diplom Biologie, Albertus-Magnus-Universität, Köln
1996-1997	Diplomarbeit im Max-Delbrück-Laboratorium am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln unter der Leitung von Dr. Nils Johnsson; "Eine neue Methode zur Charakterisierung von Translokationsmutanten in der Hefe <i>S.cerevisiae</i> "
1997-2000	Doktorarbeit im Max-Delbrück-Laboratorium am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln unter der Betreuung von Priv. Doz. Dr. Nils Johnsson