

***In vivo*-Charakterisierung von Komponenten
des Translokationsapparates des
Endoplasmatischen Retikulums der Hefe
*Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sandra Wittke
aus Aachen

Köln, 2000

Berichterstatter:

Herr Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson

Herr Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung:

6.11.2000

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis ----- | I |
| 1 Einleitung ----- | 1 |
| <i>1.1 Die Translokation von Proteinen in das ER -----</i> | <i>1</i> |
| 1.1.1 Die kotranslationale Translokation ----- | 2 |
| 1.1.2 Die posttranslationale Translokation ----- | 5 |
| 1.1.3 Die Funktion des Sec62p in der posttranslationalen Translokation ----- | 8 |
| 1.2 Die Split-Ubiquitin-Methode----- | 9 |
| 1.3 Zielsetzung der Arbeit----- | 12 |
| 2 Material und Methoden ----- | 13 |
| 2.1 <i>Material</i> ----- | <i>13</i> |
| 2.1.1 Chemikalien und Enzyme ----- | 13 |
| 2.1.2 Antikörper ----- | 13 |
| 2.1.3 Antibiotika ----- | 13 |
| 2.1.4 Proteinmarker ----- | 14 |
| 2.1.5 Oligonukleotide ----- | 14 |
| 2.1.6 Kulturmedien ----- | 15 |
| 2.1.7 Bakterienstämme ----- | 17 |
| 2.1.8 Hefestämme ----- | 17 |
| 2.1.9 Vektoren (Plasmide)----- | 18 |
| 2.2 <i>Methoden</i> ----- | <i>19</i> |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden ----- | 19 |
| 2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA----- | 19 |
| 2.2.1.2 Extraktion von DNA ----- | 20 |
| 2.2.1.3 Präzipitation von DNA----- | 20 |
| 2.2.1.4 DNA-Sequenzierung ----- | 20 |
| 2.2.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten----- | 20 |
| 2.2.1.5.1 Restriktionsschnitt von Plasmid-DNA ----- | 20 |
| 2.2.1.5.2 Alkalische Phosphatase-Behandlung----- | 21 |
| 2.2.1.5.3 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Enzym----- | 21 |
| 2.2.1.5.4 Ligation der DNA-Fragmente----- | 21 |
| 2.2.1.6 Agarose Gelelektrophorese----- | 21 |
| 2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ----- | 22 |
| 2.2.1.8 Klionierte Vektoren ----- | 22 |
| 2.2.1.9 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien----- | 27 |
| 2.2.1.10 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA ----- | 28 |
| 2.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien ----- | 28 |
| 2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)----- | 29 |
| 2.2.1.13 Herstellung kompetenter Hefen ----- | 29 |
| 2.2.1.14 Transformation kompetenter Hefen mit Plasmid-DNA ----- | 30 |
| 2.2.1.14.1 Transformation von Hefen mit autonom replizierenden Plasmiden----- | 30 |
| 2.2.1.14.2 Integrative Transformation von Hefen (Hinnen <i>et al.</i> , 1978) ----- | 30 |
| 2.2.1.15 Deletion eines Gens im Hefegenom ----- | 32 |
| 2.2.1.16 Präparation von genomischer Hefe-DNA ----- | 32 |
| 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden ----- | 33 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.2.1 | Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Hefen ----- | 33 |
| 2.2.2.2 | Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford----- | 34 |
| 2.2.2.3 | Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ----- | 34 |
| 2.2.2.4 | Westernblotanalyse ----- | 35 |
| 2.2.2.5 | Koimmunpräzipitation----- | 36 |
| 2.2.2.5.1 | Koimmunpräzipitation löslicher Proteine----- | 36 |
| 2.2.2.5.2 | Koimmunpräzipitation von Membranproteinen----- | 37 |
| 2.2.3 | Zellbiologische Methoden ----- | 38 |
| 2.2.3.1 | Physiologischer Wachstumstest (Interaktionstest) ----- | 38 |
| 2.2.3.2 | Semiquantitative Analyse der Konkurrenzexperimente ----- | 39 |
| 2.2.3.3 | Paarung (Kreuzung) transformierter, haploider Hefen----- | 40 |
| 2.2.3.4 | Semiquantitativer Paarungstest----- | 40 |
| 2.2.3.5 | Sporulation von Hefen und Tetradensektion ----- | 40 |
| 2.2.4 | Bildbearbeitung----- | 41 |
| 3 | Ergebnisse ----- | 42 |
| 3.1 | <i>Bestimmung der räumlichen Nähe zwischen den ER-Translokonproteinen Sec62p und Sec63p in vivo</i> ----- | 42 |
| 3.1.1 | Funktionalität der Fusionsproteine Sec63-C _{UB} -Dha und Sec63-C _{UB} -RUra3p----- | 45 |
| 3.1.2 | Sec62p und Sec63p interagieren <i>in vivo</i> ----- | 45 |
| 3.1.3 | Die Interaktion von Sec63-C _{UB} -RUra3p und N _{UB} -Sec62p ist mit unmodifiziertem Sec62p kompetitierbar ----- | 48 |
| 3.2 | <i>Die mit der Split-Ub-Methode gemessenen Distanzen von Sec63p zu Proteinen bekannter Lokalisation ermöglichen eine grobe Kartierung der Zelle</i> ----- | 50 |
| 3.2.1 | Sec63p zeigt die größte Nähe zu Proteinen des Translokationskomplexes ----- | 53 |
| 3.2.2 | Der Einsatz der neuen N _{UB} -Version N _{VI} ermöglicht die Abgrenzung des Sed5p von den ER-Membranproteinen ----- | 54 |
| 3.2.3 | Das Sec61p-Homologe Ssh1p hat eine größere Distanz zu Sec63p als Sec61p----- | 55 |
| 3.2.4 | Die mit Sec63-C _{UB} -RUra3p gemessenen Distanzen zu Translokonkomponenten sind spezifisch----- | 55 |
| 3.2.5 | Der Einsatz weiterer C _{UB} -Markerproteine ermöglicht die Unterscheidung zwischen Proteinen des <i>trans</i> -Golgi, der Plasmamembran und des Mitochondriums ----- | 57 |
| 3.2.5.1 | Charakterisierung des mitochondrialen Kompartimentes ----- | 57 |
| 3.2.5.2 | Charakterisierung des späten Golgi-Kompartimentes ----- | 58 |
| 3.2.5.2.1 | Funktionalität des Kex2-C _{UB} -RUra3p-Fusionsproteins ----- | 58 |
| 3.2.5.2.2 | Kex2p zeigt eine größere Nähe zu Snc1p als zu Sso1p ----- | 59 |
| 3.2.6 | Sec63p interagiert nicht mit endosomalen, vakuolären und cytosolischen Proteinen ----- | 61 |
| 3.3 | <i>Charakterisierung der Sec63p-Bindungsdomäne im Sec62-Protein</i> ----- | 61 |
| 3.3.1 | Funktionalität der Sec62p-Deletionsmutanten ----- | 63 |
| 3.3.1.1 | Darstellung eines Sec62p-Deletionsstammes ----- | 63 |
| 3.3.1.2 | Der gesamte N-Terminus und der äußerste C-Terminus des Sec62p sind nicht essentiell ----- | 64 |
| 3.3.2 | N- und C-Terminus des Sec62p binden an den Sec-Komplex ----- | 67 |
| 3.3.3 | Der direkte Split-Ub-Test bestätigt die Konkurrenzergebnisse----- | 72 |
| 3.3.4 | Die C-terminalen Deletionsmutanten sind durch Überexpression des Sec62p kompetitierbar----- | 74 |
| 3.3.5 | Das <i>sec62-1</i> -Protein bindet deutlich schwächer an den Sec-Komplex ----- | 76 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.3.6 | Der Aminoterminus des Sec62p bindet an die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p ----- | 79 |
| 3.3.7 | Keiner der cytosolischen Termini des Sec62p ist hinreichend für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex ----- | 84 |
| 3.4 | <i>Analyse von Sec62-Proteinen aus anderen Spezies</i> ----- | 87 |
| 3.4.1 | Kompetitionseffizienz der Sec62p-Homologen aus anderen Spezies ----- | 89 |
| 3.4.2 | Funktionalität der Sec62p homologen Proteine aus anderen Spezies ----- | 90 |
| 4 | Diskussion ----- | 93 |
| 4.1 | <i>Die Interaktion der Translokonkomponenten Sec63p und Sec62p</i> ----- | 93 |
| 4.2 | <i>Bestimmung des molekularen Umfeldes des ER-Membranproteins Sec63p in vivo</i> --- | 96 |
| 4.2.1 | Distanz zwischen Sec63p und ER-Membranproteinen----- | 97 |
| 4.2.2 | Distanz zwischen Sec63p und Sed5p ----- | 98 |
| 4.2.3 | Einsatz von weiteren C _{UB} -RUra3p-modifizierten Proteinen ----- | 99 |
| 4.2.4 | Distanz zwischen Sec63p und Proteinen des späten sekretorischen Weges bzw. cytosolischen Proteinen----- | 102 |
| 4.2.5 | Gegenselektion der C63R-5-51-Zellen auf FOA-haltigen Platten----- | 103 |
| 4.3 | <i>Charakterisierung der Bindung zwischen Sec63p und Sec62p</i> ----- | 103 |
| 4.3.1 | Sec62p besitzt mindestens zwei Sec-Komplex-Bindungsdomänen und eine essentielle Domäne ----- | 104 |
| 4.3.1.1 | Strukturelle Charakterisierung des Sec62p ----- | 105 |
| 4.3.1.1.1 | Sec62p besitzt mindestens zwei Sec-Komplex-Bindungsregionen ----- | 105 |
| 4.3.1.1.2 | Der Aminoterminus des Sec62p ist notwendig und hinreichend für die Bindung an den Sec-Komplex ----- | 107 |
| 4.3.1.1.3 | sec62-1p bindet nicht mehr effektiv an den Sec-Komplex----- | 107 |
| 4.3.1.2 | Funktionelle Charakterisierung des Sec62p ----- | 108 |
| 4.3.1.3 | Die cytosolischen Termini des Sec62p sind nicht allein für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex verantwortlich ----- | 109 |
| 4.3.2 | Die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p binden an den Sec62p-Aminoterminus----- | 109 |
| 4.3.3 | Funktion des Sec63p-Carboxyterminus ----- | 112 |
| 4.3.4 | Analyse von Sec62p-Homologen aus anderen Spezies ----- | 113 |
| 4.4 | <i>Ausblick</i> ----- | 114 |
| 5 | Zusammenfassung ----- | 116 |
| 6 | Anhang ----- | 118 |
| 7 | Literaturverzeichnis ----- | 122 |

Abkürzungsverzeichnis

A

| | |
|------------|-------------------------|
| a | aliphatische Aminosäure |
| α - | anti- |
| Abb | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxiddisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |

B

| | |
|------|--------------------|
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |

C

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| ca. | circa |
| cDNA | komplementäre DNA |
| C-terminal | carboxyterminal |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| C _{UB} | C-terminale Ubiquitinhälfte |

D

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| dest. Wasser | destilliertes Wasser |
| Dha | Dihydrofolatreduktase mit ha-Epitop |
| DHFR | Dihydrofolatreduktase |
| Diagr. | Diagramm |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |

E

| | |
|----------------|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Natrium-ethyldiamin-tetraessigsäure |
| EM | Elektronenmikroskop |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| <i>et al.</i> | <i>et altera</i> |
| EtOH | Ethanol |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| eq | Membranequivalent(e) |

F

| | |
|---------------------------|--|
| Flag | Flag-Epitop |
| Flag-63 _{CT} | C-Terminus des Sec63p, umfasst die letzten 419 Aminosäuren, modifiziert mit dem Flag-Epitop |
| Flag63 _{CT} ΔC14 | um 14 Aminosäuren verkürzter C-Terminus des Sec63p, umfasst die letzten 405 Aminosäuren, modifiziert mit dem Flag-Epitop |
| Flag63 _{CT} ΔC47 | um 47 Aminosäuren verkürzter C-Terminus des Sec63p, umfasst die letzten 372 Aminosäuren, modifiziert mit dem Flag-Epitop |
| Flag-Fpr1-63C14 | Fpr1p, welches C-terminal um die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p verlängert wurde, modifiziert mit dem Flag-Epitop |
| Flag-Fpr1-63C47 | Fpr1p, welches C-terminal um die letzten 47 Aminosäuren des Sec63p verlängert wurde, modifiziert mit dem Flag-Epitop |
| FOA | 5-Fluor-Orothsäure |
| FOA ^R | FOA-resistent |
| FOA ^S | FOA-sensitiv |

H

| | |
|------------|--|
| h | Stunde(n) |
| ha | Hämagglutinin-Epitop |
| HBST | HEPES-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| H. sapiens | Homo sapiens |
| Hsp | Hitzeschockprotein |

K

| | |
|------|----------------|
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KOAc | Kaliumacetat |

L

| | |
|-------|---------------|
| LB | Luria-Bertani |
| LiOAc | Lithiumacetat |
| Lsg. | Lösung |

M

| | |
|-------------|---|
| M | mol/l |
| <i>Mata</i> | Genlokus für den a -Paarungstyp der Hefe |
| <i>Mato</i> | Genlokus für den α -Paarungstyp der Hefe |
| MgOAc | Magnesiumacetat |
| min | Minute(n) |
| Mito | Mitochondrium |
| MOPS | 3-(N-morpholino)-propansulfonsäure |

N

| | |
|-----------------|--|
| NaOAc | Natriumacetat |
| NEM | N-Ethylmaleimid |
| N-terminal | Aminoterminal |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| N _{UB} | N-terminale Ubiquitinhälfte mit variablem Aminosäurerest an Position 13 |
| N _{UA} | N-terminale Ubiquitinhälfte mit einem Alaninrest an Position 13 |
| N _{UI} | N-terminale Ubiquitinhälfte mit dem nativen Isoleucinrest an Position 13 |
| N _{UG} | N-terminale Ubiquitinhälfte mit einem Glycinrest an Position 13 |
| N _{VI} | N-terminale Ubiquitinhälfte mit einem Valinrest an Position 3 |

O

| | |
|------------------|---|
| OD _{nm} | optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge in nm |
| ORF | offene(s) Leseraster |

P

| | |
|--------------------------|---|
| Pa | Pascal |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| <i>P_{CUP1}</i> | Nukleotidsequenz des Kupfer-Metallothionein-Promotors |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pers. | persönlich |
| <i>P_{GALI}</i> | Nukleotidsequenz des Galaktose-Promotors |
| PM | Plasmamembran |
| <i>P_{MET25}</i> | Nukleotidsequenz des Methionin-Promotors |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| Ponceau-S | 3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure |

R

| | |
|--------|---|
| Rep | Reporterprotein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| RUra3p | Orothidin-5'-Phosphat-Decarboxylase mit N-terminaler Aminosäure Arginin |

S

| | |
|----------------------|--|
| s | Sekunden |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SD | Synthetisches Dropout |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sec62 _{SC} | Sec62p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

| | |
|--------------------------|---|
| Sec62 _{YL} | homologes Sec62p aus <i>Yarrowia lipolytica</i> |
| Sec62 _{SP} | homologes Sec62p aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| Sec62 _{HS} | homologes Sec62p aus <i>Homo sapiens</i> |
| Sec62 _{SC} -Dha | Sec62p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , modifiziert mit Dha |
| Sec62 _{YL} -Dha | homologes Sec62p aus <i>Yarrowia lipolytica</i> , modifiziert mit Dha |
| Sec62 _{SP} -Dha | homologes Sec62p aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , modifiziert mit Dha |
| Sec62 _{HS} -Dha | homologes Sec62p aus <i>Homo sapiens</i> , modifiziert mit Dha |
| Split-Ub | Split-Ubiquitin |
| <i>S. pombe</i> | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| SRP | Signal Recognition Particle |

T

| | |
|---------|---|
| Tab | Tabelle |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TM | Transmembrandomäne(n) |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |
| t-SNARE | auf der Zielmembran lokalisierter SNAP-Rezeptor |

U

| | |
|-------|-------------------------------------|
| U | Enzymeinheit |
| u. Ä. | und Ähnliches |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| Ub | Ubiquitin |
| Ubps | Ubiquitin-spezifische Proteasen |
| Ura | Uracil |
| Ura3p | Orothidin-5'-Phosphat-Decarboxylase |
| UTR | untranslatierte Region |
| UV | Ultraviolett |
| ü/N | über Nacht |
| ÜS | Überstand |

V

| | |
|---------|--|
| vergl. | vergleiche |
| v-SNARE | auf Vesikeln lokalisierter SNAP-Rezeptor |
| V/V | Volumen pro Volumen |

W

| | |
|-----|---------------------|
| wt | Wildtyp |
| W/V | Gewicht pro Volumen |

Y

| | |
|----------------------|----------------------------|
| <i>Y. lipolytica</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> |
|----------------------|----------------------------|

Z

z. B.

zum Beispiel

| | |
|---------------------------------|--|
| Δ C19-Dha | Sec62p, dem die letzten 19 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ C35-Dha | Sec62p, dem die letzten 35 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ C60-Dha | Sec62p, dem die letzten 60 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ C76-Dha | Sec62p, dem die letzten 76 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ N107-Dha | Sec62p, dem die ersten 107 Aminosäuren des N-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ N153-Dha | Sec62p, dem die ersten 153 Aminosäuren des N-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ N107/ Δ C35-Dha | Sec62p, dem die ersten 107 Aminosäuren des N- und die letzten 35 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| Δ N153/ Δ C60-Dha | Sec62p, dem die ersten 153 Aminosäuren des N- und die letzten 60 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, modifiziert mit Dha |
| 1TM-Dha | Sec62p, dem die letzten 99 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, so dass es noch 1 Transmembrandomäne besitzt, modifiziert mit Dha |
| 0TM-Dha | Sec62p, dem die letzten 125 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, so dass es keine Transmembrandomäne mehr besitzt, modifiziert mit Dha |
| 63 _{CT} | C-Terminus des Sec63p, umfasst die letzten 419 Aminosäuren |

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt.

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

Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen werden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist.

1 Einleitung

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) zeichnet sich wie alle eukaryontischen Zellen durch eine innere Kompartimentierung aus. Die verschiedenen von Membranen begrenzten Zellorganellen üben spezifische Funktionen aus, wofür sie mit einer jeweils charakteristischen Auswahl an Proteinen ausgestattet sind. Um zu gewährleisten, dass jedes Kompartiment die richtige Zusammensetzung an Proteinen erhält, muss jedes einzelne dieser Proteine zielsicher zu seinem Bestimmungsort transportiert werden. Viele Zellorganellen haben dafür spezielle Transportkomplexe entwickelt. Sie haben die Aufgabe, Proteine spezifisch durch die Organellmembran zu befördern oder in die Membran zu integrieren. So sind die Membranen der Chloroplasten, Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit sogenannten Translokons ausgestattet. Alle Translokons bestehen aus einem Multiproteinkomplex und scheinen in funktioneller Hinsicht eine ähnliche Zusammensetzung zu haben: Es existiert stets eine wasser-durchlässige Pore in der Lipiddoppelschicht, durch welche die zu transportierenden Proteine geschleust werden (Übersichtsartikel: Schatz und Dobberstein, 1996). Assoziierte Proteine erhöhen die Spezifität und Effizienz dieses Vorgangs. Die zu translozierenden Polypeptide, Translokationssubstrate genannt, besitzen definierte Aminosäuresequenzen, die sogenannten Signalsequenzen, die sie für den Transport in das adäquate Organell kennzeichnen (Übersichtsartikel: Schatz und Dobberstein, 1996).

1.1 Die Translokation von Proteinen in das ER

Die Translokation von Proteinen ins ER nimmt eine Sonderstellung ein. Nicht nur die ER-residenten, sondern auch die für das Golgi-Kompartiment, das Endosom, die Vakuole, die Plasmamembran und die zur Sekretion bestimmten Proteine müssen zunächst die ER-Membran überwinden. Eine Sequenz von acht bis zwölf hydrophoben Aminosäuren am N-Terminus dieser Proteine wirkt als Signalsequenz für ihre Translokation ins ER (Blobel und Dobberstein, 1975a, 1975b). Die Translokation dieser Proteine kann in *S. cerevisiae* auf zwei verschiedene Weisen erfolgen, ko- oder posttranslational. Die kotranslationale Translokation wurde zuerst in Säugerzellen untersucht (Walter und Blobel, 1980, 1981a, 1981b, 1982; Walter *et al.*, 1981). Die posttranslationale Translokation dagegen wurde hauptsächlich in der Hefe erforscht.

Die Proteinkomponenten, die die Proteintranslokation in das ER bewirken, sind in Abb 1.1 schematisch dargestellt.

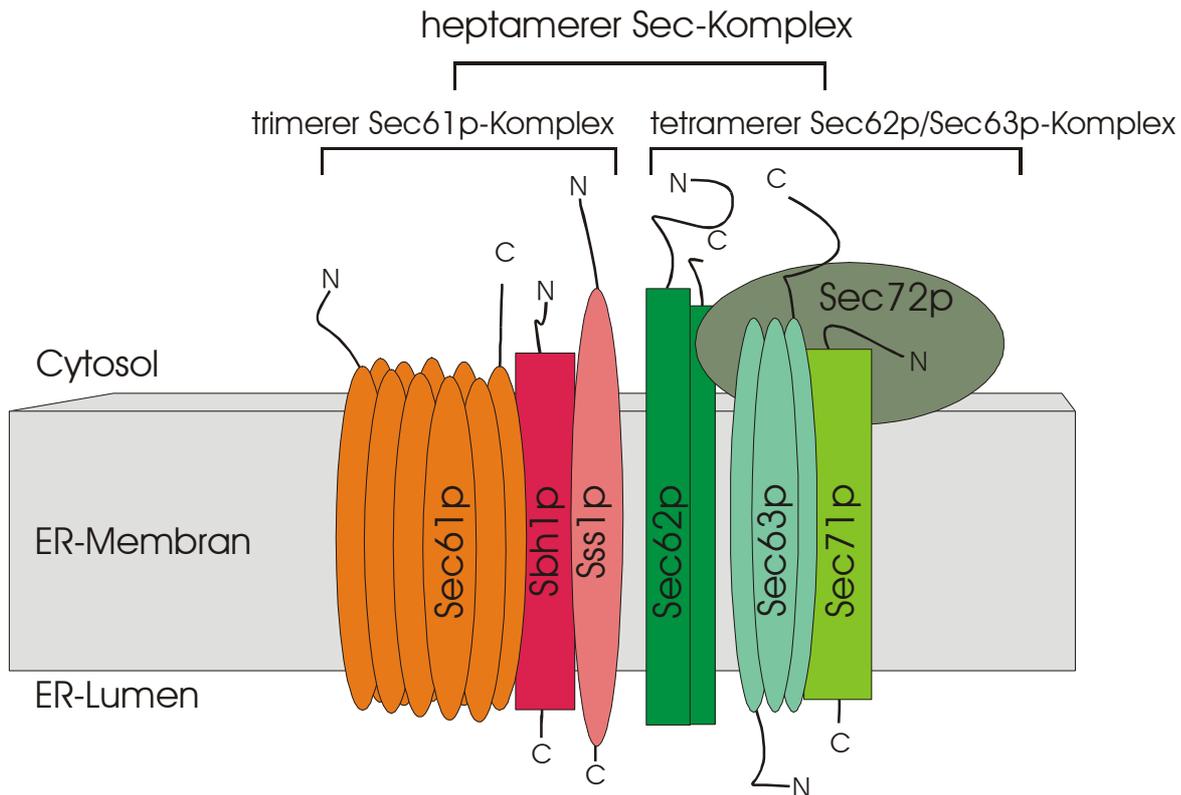


Abb 1.1: Schematische Darstellung der Komponenten des ER-Translokationskomplexes.

Der trimere Sec61p-Komplex setzt sich aus Sec61p, das die eigentliche Translokationspore bildet, Sbh1p und Sss1p zusammen. Der für die posttranslationale Translokation essentielle tetramere Sec62p/Sec63p-Komplex besteht aus Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p. Gemeinsam werden die beiden Subkomplexe unter dem Begriff „heptamerer Sec-Komplex“ zusammengefasst.

1.1.1 Die kotranslationale Translokation

Bei der kotranslationalen Translokation wird die Translokation eines Proteins noch während seiner Synthese am Ribosom initiiert (Abb 1.2). Sobald die Signalsequenz synthetisiert ist und aus dem Ribosom hervortritt wird sie vom Signal Recognition Particle (SRP), einem Ribonukleoprotein-Komplex, erkannt (Walter und Blobel, 1980, 1982; Hann und Walter, 1991). Die Bindung des SRP an Signalsequenz und Ribosom führt zum temporären Stopp der Proteintranslation (Walter und Blobel, 1981a; Lipp *et al.*, 1987). Der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP wird an die ER-Membran geführt, wo SRP auf der cytoplasmatischen Seite der Membran an den SRP-Rezeptor andockt (Gilmore *et al.*, 1982a, 1982b). Sec61p stimuliert die GTP-abhängige Ablösung der naszierenden Kette vom SRP (Song *et al.*, 2000). Die Signalsequenz wird in die Translokationspore übergeben und die Synthese des Proteins fährt fort (Übersichtsartikel: Siegel und Walter, 1988; Übersichtsartikel: Walter und Johnson, 1994). Eine weitere GTP-Hydrolyse erlaubt die Dissoziation des SRP/SRP-Rezeptor-Komplexes (Connolly *et al.*, 1991). Der hier beschriebene SRP-abhängige Mechanismus (siehe Abb 1.2) wurde in Säugerzellen *in vitro* ausgearbeitet. Der Nachweis des Hefe-SRP (Hann *et al.*, 1989;

gerzellen *in vitro* ausgearbeitet. Der Nachweis des Hefe-SRP (Hann *et al.*, 1989; Amaya *et al.*, 1990) und sein Einfluss auf die Translokation (Hann und Walter, 1991; Amaya und Nakano, 1991) erfolgte erst später. Der hohe Konservierungsgrad des SRP und SRP-Rezeptors von Bakterien hin zu Säugerzellen weist auf ihre große Bedeutung für die kotranslationale Translokation hin (Wolin, 1994).

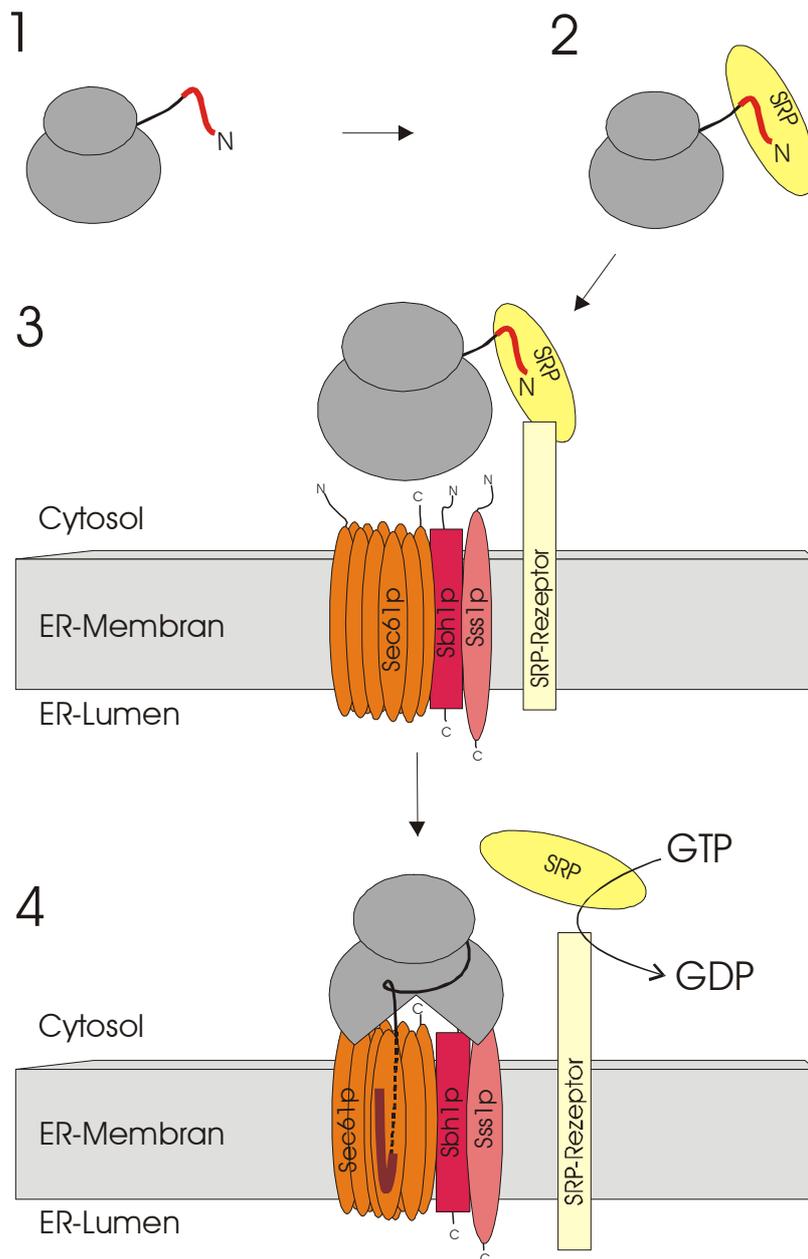


Abb 1.2: Schematische Darstellung des Ablaufs der kotranslationalen Translokation.

(1) Sobald die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette (rot gekennzeichnet) aus dem Ribosom austritt, wird sie vom SRP erkannt. (2) Die Bindung des SRP an die Signalsequenz stoppt die Proteintranslation. Der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP wird an die ER-Membran transportiert. (3) Hier dockt SRP an seinen Rezeptor an. (4) Sec61p-stimulierte GTP-Hydrolyse bewirkt die Ablösung der naszierenden Polypeptidkette, die nun in die Translokationspore (Sec61p) eingeschleust wird, vom SRP. Die Translation fährt fort und das entstehende Protein wird durch die Translokationspore geschleust. Das Ribosom sitzt fest auf dem Sec61p-Komplex und schließt die Pore dicht vom Cytosol ab.

Der zentrale Komplex des ER-Translokationsapparates der Hefe besteht aus drei Transmembranproteinen, Sec61p, Sbh1p und Sss1p, der als trimerer Sec61p-Komplex bezeichnet wird (Übersichtsartikel: Matlack *et al.*, 1998). Drei bis vier Oligomere dieser Sec61p-Komplexe lagern sich zu einer im EM sichtbaren Ringstruktur zusammen, die sehr wahrscheinlich die eigentliche Translokationspore darstellt (Hanein *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997). Das den Kanal auskleidende Protein ist Sec61p. Es durchspannt die ER-Membran zehnmals, wobei N- und C-Terminus im Cytosol liegen (Wilkinson *et al.*, 1996; Plath *et al.*, 1998). Sec61p wurde zuerst in einer genetischen Selektion identifiziert (Deshaies und Schekman, 1987; Stirling *et al.*, 1992). Sbh1p und Sss1p besitzen nur je ein die ER-Membran durchspannendes Segment in der Nähe ihrer C-Termini. *SEC61* und *SSS1* sind essentielle Gene, wohingegen die Deletion von *SBH1* keine Auswirkungen auf das Wachstum von Hefezellen hat und zu einer nur schwachen Anhäufung von Translokationssubstraten im Cytosol der Zelle führt (Finke *et al.*, 1996).

Während der kotranslationalen Translokation wird eine enge Bindung zwischen Ribosom und heterotrimerem Sec61p-Komplex gebildet (Übersichtsartikel von Rapoport *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997). Durch diesen engen Kontakt wird die Richtung der Translokation eindeutig vorgegeben und es wird keine andere Energie benötigt als die der Proteinsynthese selbst. Außerdem wird so gewährleistet, dass keine kleinen Moleküle während des Translokationsprozesses durch die Pore gelangen (Crowley *et al.*, 1994). Die Komponenten des Translokationsapparates sind evolutionär sehr alt und hoch konserviert. Es existiert ein homologer trimerer Sec61p-Komplex in Säugerzellen; die drei Proteine werden hier Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ genannt (Görlich *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1994; Panzner *et al.*, 1995). In *E. coli* gibt es Homologe für Sec61p (SecY) und Sss1p (SecE), das dritte Protein SecG entspricht nicht dem Sbh1p aus der Hefe (Ito, 1984; Nishiyama *et al.*, 1993; Hartmann *et al.*, 1994). Neben dem trimeren Sec61p-Komplex gibt es einen weiteren heterotrimeren Proteinkomplex von verwandter Zusammensetzung in der ER-Membran der Hefe (Finke *et al.*, 1996). Er besteht aus den Membranproteinen Ssh1p, Sbh2p und Sss1p. Ssh1p ist in Sequenz und Struktur homolog zu Sec61p und könnte somit eine alternative Translokationspore bilden. Die Aminosäuresequenz des Sbh2p ist zu 50% identisch mit derjenigen des Sbh1p. Die dritte Komponente, Sss1p teilen sich beide trimeren Komplexe. Bisher konnte keine Beteiligung des zweiten Komplexes, des Ssh1p-Komplexes, an der Proteintranslokation nachgewiesen werden. Finke *et al.* konnten lediglich zeigen, dass die Translokation des Prepro- α -Faktors verzögert verläuft, wenn sowohl *SBH1* als auch *SBH2* im Hefegenom deletiert worden sind. Die alleinige Deletion von *SBH2* hat keinen Einfluss auf die Effizienz der Translokation dieses Substrates (Finke *et al.*, 1996).

1.1.2 Die posttranslationale Translokation

Die Deletion der Gene einzelner SRP-Komponenten erwies sich als nicht letal für die Hefezelle (Hann und Walter, 1991). Dies ließ auf die Existenz eines SRP-unabhängigen Mechanismus der Proteintranslokation schließen. Bei der SRP-unabhängigen, posttranslationalen Translokation ist die Synthese des Proteins vor seinem Transport über die ER-Membran weit vorangeschritten oder aber bereits abgeschlossen (Abb 1.3). Die posttranslationale Translokation wurde intensiv in *S. cerevisiae* untersucht. Der Prozess kann mit rekonstituierten Proteoliposomen, die lediglich acht Proteine enthalten, reproduziert werden (Panzner *et al.*, 1995). Neben dem trimeren Sec61p-Komplex ist ein zweiter Protein-Subkomplex, der tetramere Sec62p/Sec63p-Komplex (siehe Abb 1.1), sowie das ER-luminale Chaperon Kar2p vonnöten. Der tetramere Sec62p/Sec63p-Komplex besteht aus den Transmembranproteinen Sec62p, Sec63p und Sec71p, sowie aus dem auf der cytosolischen Membranseite peripher assoziierten Sec72p (Übersichtsartikel: Rapoport *et al.*, 1999). Deshaies *et al.* konnten 1991 zeigen, dass es sich um einen stabilen, immunpräzipitierbaren Komplex handelt. Die Abwesenheit von Sec61p in nativen Immunpräzipitaten ohne vorherige Kreuzvernetzung lässt eine nur schwache Assoziation von Sec61p mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex vermuten.

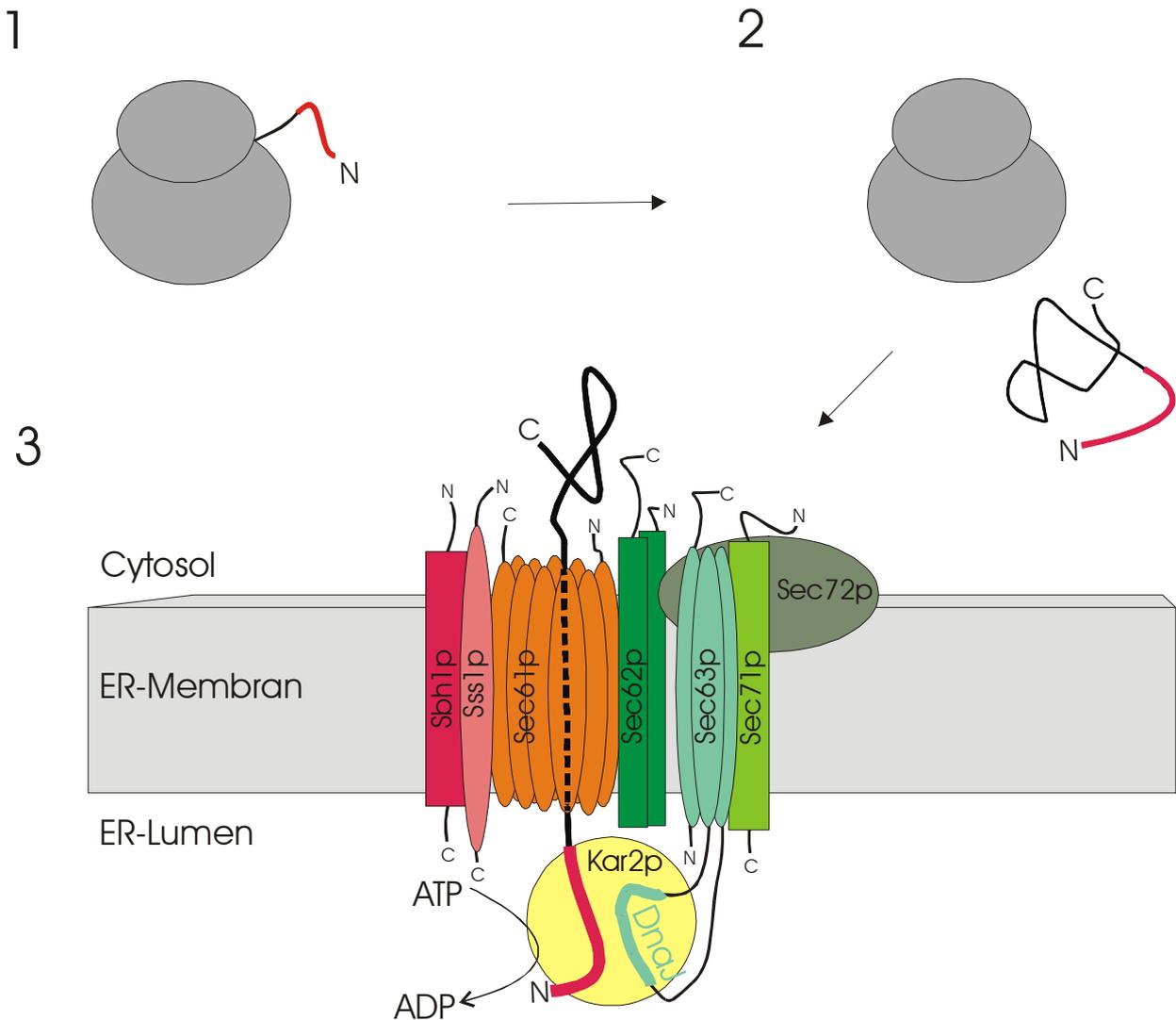


Abb 1.3: Schematische Darstellung des Ablaufs der posttranslationalen Translokation.

(1) Die aus dem Ribosom austretende Signalsequenz (rot gekennzeichnet) wird nicht vom SRP gebunden. (2) Das Protein wird vollständig im Cytosol synthetisiert und wahrscheinlich mit Hilfe von Chaperonen in einem teilweise ungefalteten Zustand gehalten. Das zu translozierende Protein wird anschließend an die ER-Membran transportiert, wo es an einen noch nicht identifizierten Rezeptor andockt. Hierbei dient die Signalsequenz als Erkennungssignal. (3) Mit dem N-Terminus voran wird das Polypeptid durch die Translokationspore (Sec61p) geschleust. Auf der luminalen ER-Seite rekrutiert die DnaJ-Domäne von Sec63p (türkis) die ATPase Kar2p an den Ort der Translokation. Kar2p bindet das ankommende Protein und bewirkt unter ATP-Verbrauch die gerichtete Translokation des Proteins.

Sec63p ist ein essentielles Protein von 663 Aminosäuren (73 kDa). Es durchspannt die Membran dreimal, enthält einen stark negativ geladenen cytosolischen C-Terminus und einen ins ER-Lumen gerichteten N-Terminus (Feldheim *et al.*, 1992). Ein zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne gelegener, luminaler Sequenzabschnitt im Sec63-Protein weist starke Homologie zum DnaJ-Hitzeschockprotein aus *E. coli* auf (Sadler *et al.*, 1989; Feldheim *et al.*, 1992). Sec63p interagiert *in vivo* und *in vitro* mittels dieser DnaJ-Domäne mit dem luminalen Chaperon Kar2p (Sanders *et al.*, 1992; Brodsky und Schekman, 1993; Scidmore *et al.*, 1993; Brodsky *et al.*, 1995; Lyman und Schekman, 1995; Corsi und Schekman, 1997; Matlack *et al.*,

1997, 1999), das dem BiP in Säugerzellen entspricht. Kar2p zeigt eine Sequenzverwandtschaft zu dem DnaK-Hitzeschockprotein aus *E. coli*, einem Bindungspartner des DnaJ-Hitzeschockproteins, und zu anderen Mitgliedern der Hsp70-Proteinfamilie (Brodsky und Schekman, 1993; Scidmore *et al.*, 1993). Die Interaktion zwischen Sec63p und der ATPase Kar2p ist für die posttranslationale Translokation essentiell (Vogel *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1991). Wahrscheinlich rekrutiert Sec63p durch seine DnaJ-Domäne Kar2p zum Ort der Translokation, wo letzteres an die naszierende Polypeptidkette bindet und als sogenannte „Brownian Ratchet“ das Zurückrutschen des Translokationssubstrates ins Cytosol verhindert (Simon *et al.*, 1992; Matlack *et al.*, 1999). Man nimmt an, dass Kar2p das Translokationssubstrat unspezifisch mit geringer Affinität bindet und während mehrerer Zyklen des Bindens und Entlassens unter ATP-Verbrauch der ursprünglich ungerichteten Diffusion des Substrates die Richtung in das Lumen des ER weist. Gemäß einer anderen Vermutung spielt Kar2p eine aktivere Rolle, indem es das Translokationssubstrat unter Energieverbrauch ins ER-Lumen zieht (Glick, 1995; Pilon *et al.*, 1998).

Das Translokation-Protein Sec62p besteht aus 283 Aminosäuren (32 kDa) und durchspannt die ER-Membran zweimal. Der überwiegend positiv geladene N-Terminus (158 Aminosäuren) und der C-Terminus (77 Aminosäuren) ragen ins Cytosol (Deshaies und Schekman, 1990). Mutanten des Sec62-Proteins wurden erstmals bei der Selektion nach konditional letalen Mutanten identifiziert, die ein Signalsequenz-tragendes Reporterprotein nicht mehr ins ER translozieren konnten (Deshaies und Schekman, 1987). Mutationen in dem essentiellen *SEC62*-Gen verursachen den Anstau untranslozierter Vorläufer einer Reihe von sekretorischen Proteinen im Cytosol (Rothblatt *et al.*, 1989).

Im Gegensatz zu Sec63p und Sec62p sind die zwei übrigen Proteine des tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplexes, Sec71p und Sec72p, nicht essentiell für die Lebensfähigkeit der Hefe (Rothblatt *et al.*, 1989; Vogel *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1994). Allerdings kann auch in Hefezellen, in denen *SEC71* bzw. *SEC72* deletiert wurde, ein Anstau von Translokationssubstraten beobachtet werden (Feldheim *et al.*, 1993)

Neben den Aufgaben bei der Translokation haben alle Komponenten des tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplexes bis auf Sec62p zusätzlich eine Funktion bei der Fusion beider Kernmembranen während der Karyogamie (Ng und Walter, 1996). Die Verschmelzung zweier Kerne findet statt, nachdem sich zwei haploide Zellen unterschiedlicher Paarungstypen zu einer diploiden Zelle vereint haben (Übersichtsartikel: Marsh und Rose, 1997). Der Mechanismus und die Funktion, die die ER-Translokationskomponenten hierbei ausüben, ist noch unbekannt.

1.1.3 Die Funktion von Sec62p in der posttranslationalen Translokation

Vor der eigentlichen Translokation ist die Signalsequenzerkennung der wesentliche Vorgang, der für die Spezifität des Prozesses sorgt. Bei der kotranslationalen Translokation übernehmen SRP und Sec61p die spezifische Erkennung der Signalsequenz. Die Komponenten, die bei der posttranslationalen Translokation für den ersten und spezifischen Kontakt mit der Signalsequenz verantwortlich sind, wurden noch nicht eindeutig identifiziert. Die Daten von Ng *et al.* (1996) beweisen jedoch, dass es auch hier eine spezifische Signalsequenzerkennung geben muss. Das Ausmaß an Hydrophobizität einer Signalsequenz diktiert offenbar als einziges Charakteristikum die Wahl des Translokationsmodus (Ng *et al.*, 1996). Proteine mit sehr hydrophoben Signalsequenzen werden in Abwesenheit des SRP nicht transloziert, also von den Komponenten des posttranslationalen Translokationsapparates nicht erkannt. Proteine mit schwach hydrophoben Signalsequenzen hingegen werden in Abwesenheit des Sec62p/Sec63p-Komplex nicht transloziert.

Da Sec62p bisher noch keine eindeutige Rolle während der posttranslationalen Translokation zugewiesen werden konnte, für das Überleben der Hefe jedoch essentiell ist, könnte dieses Protein möglicherweise direkt an der Signalsequenzerkennung beteiligt sein. Sec62p kann mit einem die Translokationspore durchquerenden Translokationssubstrat *in vitro* kreuzvernetzt werden (Müsch *et al.*, 1992). Prepro- α -Faktor konnte nur in Abwesenheit von ATP mit Sec62p kreuzvernetzt werden, was auf eine frühe, transiente Interaktion von Sec62p mit dem Translokationssubstrat schließen lässt. Die ATP-abhängige Ablösung des Translokationssubstrates von Sec62p wird durch Kar2p und dessen Interaktion mit Sec63p reguliert (Lyman und Schekman, 1997). Weitere Hinweise auf ein frühes Eingreifen von Sec62p während der posttranslationalen Translokation geben Studien mit dem *sec62-1*-Allel. Die temperatursensitive *sec62-1*-Mutation resultiert *in vivo* (Rothblatt *et al.*, 1989) und *in vitro* (Deshaies und Schekman, 1989) in Translokationsdefekten. Sanders *et al.* zeigten 1992, dass in *sec62-1*-Zellen die Interaktion des Translokationssubstrates mit der Pore behindert ist. Wahrscheinlich führt diese Mutation zur Instabilität des Sec62-Proteins, denn in aus *sec62-1*-Zellen isolierten Translokationskomplexen ist Sec62p abwesend (Lyman und Schekman, 1997). Es gibt Hinweise auf eine mögliche direkte Beteiligung von Sec62p an der Signalsequenzerkennung. Plath *et al.* zeigten 1998, dass das hydrophobe Zentrum einer Signalsequenz außer mit Sec61p auch mit Sec62p chemisch kreuzvernetzt werden kann. Dünwald *et al.* konnten 1999 erstmals *in vivo* belegen, dass Sec62p der Signalsequenz des α -Faktors während seiner Translokation räumlich benachbart ist und somit Teil eines Signalsequenz-bindenden Komplexes sein könnte.

1.2 Die Split-Ubiquitin-Methode

Das von N. Johnsson und A. Varshavsky entwickelte Split-Ubiquitin-Verfahren (Abb 1.5) ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* (Johnsson und Varshavsky, 1994a). Grundlage dieser Methode bilden die besonderen Eigenschaften des Moleküls Ubiquitin. Ubiquitin ist ein kleines, kompaktes Protein von 76 Aminosäuren, deren Sequenz in allen Eukaryonten hochkonserviert ist (Übersichtsartikel: Hershko und Ciechanover, 1992). Die Röntgenstrukturanalyse dokumentiert, dass Ubiquitin aus einer einzigen Domäne besteht, die sich aus einem viersträngigen β -Faltblatt und einer amphiphilen α -Helix zusammensetzt (Vijay-Kumar *et al.*, 1987a, 1987b; Abb 1.4). Seine Funktion besteht vor allem in der Markierung zum Abbau bestimmter Proteine (Übersichtsartikel: Finley und Chau, 1991; Übersichtsartikel: Hershko und Ciechanover, 1992). Im Hefegenom existieren vier Ubiquitingene, *UBI1* bis *UBI4*. Allen vier Ubiquitingenen folgt ein weiteres offenes Leseraster, so dass Ubiquitin in der Hefezelle stets als Teil eines Fusionsproteins synthetisiert wird (Özkaynak *et al.*, 1987). In seine aktive, monomere Form gelangt Ubiquitin durch das Einwirken Ubiquitin-spezifischer Proteasen (Ubps) (Tobias und Varshavsky, 1991; Baker *et al.*, 1992). Sie schneiden das Ubiquitin-Fusionsprotein genau zwischen dem C-Terminus des vorausgehenden Ubiquitins und dem N-Terminus des nachfolgenden Proteins. Dabei ist die Aminosäuresequenz des nachfolgenden Polypeptids ohne Bedeutung für die Effizienz der Spaltungsreaktion, so dass auch artifizielle Ubiquitin-Fusionsproteine von den Ubps erkannt werden (Bachmair *et al.*, 1986). Allerdings ist die korrekte Faltung des Ubiquitins für die Spaltungsreaktion unbedingt notwendig. Mutationen, die die dreidimensionale Struktur des Proteins beeinträchtigen, verzögern die Spaltungsreaktion oder verhindern sie gänzlich (Johnsson und Varshavsky, 1994b).

Ubiquitin kann in eine N-terminale Hälfte von 37 Aminosäuren (N_{UB}) und eine C-terminale Hälfte bestehend aus 42 Aminosäuren (C_{UB}) geteilt werden. Die Split-Ub-Methode macht sich die bemerkenswerte Eigenschaft des Ubiquitins zunutze, aus seinen beiden Hälften ein nativ-ähnliches Ubiquitin-Molekül rekonstituieren zu können (Johnsson und Varshavsky, 1994a).



Abb 1.4: Strukturmodell des Ubiquitins.

Der Bereich des Proteins, der N_{UB} umfasst, ist grün dargestellt, der Bereich, der C_{UB} umfasst, blau. Der Pfeil deutet auf die Stelle im Ubiquitin, an der das Protein in die beiden Subdomänen unterteilt wurde.

Koexprimiert man N_{UB} und C_{UB} als getrennte Peptide in einer Zelle, so findet die Reassoziierung zum intakten Ubiquitin effizient statt. Der Nachweis dieser Reaktion kann über ein C-terminal an C_{UB} fusioniertes Reporterprotein erfolgen (siehe Abb 1.5). Da nur das korrekt gefaltete Ubiquitin von den Ubps als Substrat erkannt wird, wird das Reporterprotein nur dann freigesetzt, wenn die Reassoziierung von N_{UB} und C_{UB} erfolgt ist. Die alleinige Expression des C_{UB}-Fusionsproteins in der Zelle führt nicht zur Abspaltung des Reporterproteins. Die äußerst effiziente Rekonstitution zum vollständigen Ubiquitin kann durch gezielte Mutationen im N_{UB} verzögert werden. Wird das an Aminosäureposition dreizehn im N_{UB} befindliche native Isoleucin (N_{UI}) gegen Alanin (N_{UA}) oder Glycin (N_{UG}) ausgetauscht, so erfolgt die Reassoziierung in kaum messbarem Umfang. Die Affinität von C_{UB} zu N_{UA} ist hierbei größer als die zu N_{UG}. Die Reassoziierungsreaktion zum intakten Ubiquitin-Molekül kann jedoch wieder erheblich gefördert werden, wenn man C_{UB} bzw. das mutierte N_{UB} an zwei Proteine koppelt, die normalerweise in der Zelle interagieren oder räumlich benachbart sind (siehe Abb 1.5). Dies ist auf die lokale Konzentrationserhöhung der beiden Ubiquitin-Hälften, die durch die Interaktion der gekoppelten Bindungspartner verursacht wird, zurückzuführen. Die Effizienz der Reassoziierung korreliert also mit dem Ausmaß der Wechselwirkung zwischen den beiden an N_{UB} und C_{UB} gekoppelten Proteinen. Da die Aktivität der Ubps ausschließlich auf das Cytosol beschränkt ist, müssen sowohl N_{UB} als auch C_{UB} an cytosolische Proteintermini gekoppelt werden. Die Split-Ub-Methode zeichnet sich insbesondere durch die Möglichkeit aus, Interaktionen zwischen Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung *in vivo* zu messen. In der vorliegenden Arbeit wird die lokale Konzentration der N_{UB}- und C_{UB}-Fusionsproteine mit „Nähe“ dieser Proteinpartner zueinander bezeichnet.

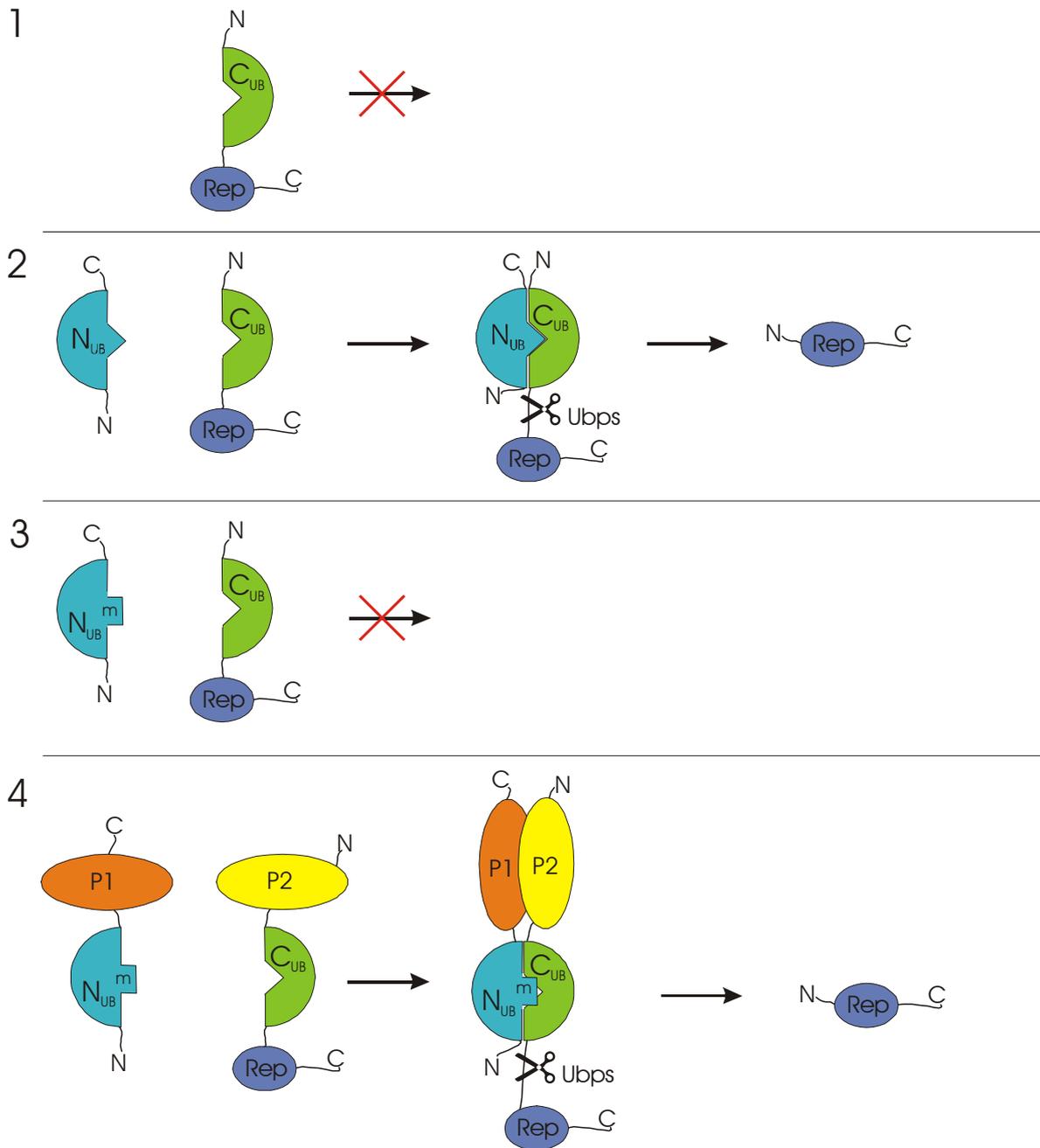


Abb 1.5: Die Split-Ub-Methode

- (1) Wird C_{UB} allein in der Zelle exprimiert, kommt es zu keiner Abspaltung des fusionierten Reporterproteins (Rep) durch die Ubps.
- (2) Werden N_{UB} und C_{UB} in einer Zelle koexprimiert, findet die Reassoziaton zum intakten Ubiquitin statt und die Ubps spalten das Reporterprotein ab.
- (3) Die gemeinsame Expression von C_{UB} und mutiertem N_{UB} ($N_{UB}^m = N_{UA}$ oder N_{UG}) führt nicht zur Rekonstitutionsreaktion.
- (4) Werden zwei interagierende oder räumlich benachbarte Proteine P1 und P2 an C_{UB} bzw. N_{UB}^m gekoppelt, so kann die Reassoziaton zum intakten Ubiquitin erneut erfolgen. Die Ubps spalten das Reporterprotein ab.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte am Beispiel der Proteine des Sec-Komplexes untersucht werden, inwieweit die Split-Ub-Methode geeignet ist, die Wechselwirkung zwischen Membranproteinen in der lebenden Zelle der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zu messen. In einem zweiten Schritt sollte diese Methode dann eingesetzt werden, um Sec62p strukturell und funktionell zu charakterisieren und zu analysieren, wie Sec62p mit den anderen Komponenten des Sec-Komplexes interagiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, analyserein von folgenden Firmen bezogen: C. Roth (Kandel), E. Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierenden Enzyme wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), New England BioLabs (Bad Schwallbach), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Gibco-BRL (Eggenstein) bezogen. Lysozym stammte von Biomol (Hamburg), RNase A von Sigma (Deisenhofen), Glukoronidase und PWO-DNA-Polymerase von Roche Diagnostics (Mannheim).

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser von Milli-Q-Reinheit angesetzt.

2.1.2 Antikörper

Für den immunologischen Nachweis von ha- oder Flag-markierten Proteinen wurden jeweils der monoklonale anti-ha-Antikörper aus der Maus (Babco, USA) und der polyklonale anti-Flag-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Zur Erkennung des Proteins Sec61p wurde ein monoklonaler anti-Sec61p-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist, verwendet (Donor: T. Sommer). Für den immunologischen Nachweis von Sec62p wurde der Antikörper anti-Sec62p verwendet (Donor: T. Rapoport). Er erkennt den äußersten C-Terminus des Proteins. Für den Nachweis des Erstantikörpers diente entweder ein Ziege-anti-Maus-IgG (anti-ha- und anti-Flag-Antikörper) oder ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG (anti-Sec62p- und anti-Sec61p-Antikörper). Die Peroxidase aus dem Meerrettich ist kovalent an diese Zweitantikörper gekoppelt (BioRad, USA).

2.1.3 Antibiotika

Ampicillin wurde den LB-Medien (2.1.6) in einer Konzentration von 1 g/l zugesetzt. Geneticin (G418) wurde in einer Konzentration von 200 mg/l in YPD-Platten (2.1.6) verwendet.

2.1.4 Proteinmarker

Zur Abschätzung der Molekulargewichte der im Immunblot detektierten Proteine wurde während der SDS-PAGE ein Markergemisch mit folgenden Standardproteinproben aufgetrennt (Pharmacia Biotech, Freiburg):

| | | |
|-----------------------|------|-----|
| Phosphorylase b | 94 | kDa |
| Albumin | 67 | kDa |
| Ovalbumin | 43 | kDa |
| Carboxyanhydrase | 30 | kDa |
| Trypsin Inhibitor | 20,1 | kDa |
| α -Lactalbumin | 14,4 | kDa |

2.1.5 Oligonukleotide

Zum Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombinationsereignisse (2.2.1.14.2) von Plasmid-DNA ins Hefegenom wurden die folgenden Oligonukleotide in PCR-Reaktionen (2.2.1.12) verwendet:

| | |
|-------------------|---|
| N _{UB} : | 5'-GATACCATCGACAACGTTAAGTCG-3' |
| C _{UB} : | 5'CTGCTTACCGCAAAGATCAATCT-3' |
| T3 : | 5'-GAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC-3' |
| T7: | 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCG-3' |
| KanRE: | 5'-GGATGTATGGGCTAAATG-3' |
| KanFW: | 5'-CCTCGACATCATCTGCC-3' |
| Flag1 : | 5'-AATTCATGTCGACCGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGC-3' |
| Flag2 : | 5'-TTCGAGCCCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGGTCGACATG-3' |
| Sec63-5: | 5'-CCCGGATCCTCTGGTAAGTTCTCAAAAAGATG-3' |
| Sec63-6: | 5'-CCCGTCGACCCGCCTTCTGGTGATTCATCATCTTC-3' |
| Sec63-7: | 5'-CCCGGATTTGCAACCAACGGA-3' |
| Sec63-10: | 5'-CACATTTCTTAACAGATGGCTG-3' |
| Sec61-3: | 5'-CCCGAATTCATGTCCTCCAACCGTGTCTAGACTTG-3' |
| Sec61-5: | 5'CCCGAATTCGGGGTGTGGAAGTATAAAAG-3' |
| Sec61-6: | 5'-CCTGATACCCCAAACACCGATCA-3' |
| Sec61-8: | 5'-CACTGGTTCACGCTTTACTTTGAAA-3' |
| Sec62-x: | 5'-CCCCGAATTCATGGTAGCCGAGCAAACACAGGAG-3' |
| Sec62-y: | 5'-CCCCGTCGACCCGCCGTTTTGTTCGGCTTTTTTCATTGATGGCTT-3' |
| Sec62-8: | 5'-ATAATTGCAGTTGAATGCAGT-3' |
| 62ctrl-1: | 5'-GAAGATCGTGTGCGACGGAATAG-3' |

62ctrl-2: 5'-GCAAGTGTCAGCAAATAGCTTC-3'
Sec62v: 5'-GAGCTATACAGGATAATGGAAG-3'

Bos-1: 5'-CCCGGATCCCTCCAGGAATGGTATGTTTGATCGCGGAG-3'
Bos-2: 5'-CCCGTTCGACAACTGTTTTCTCCAGTGAGACCAG-3'
Bos-3: 5'-GGTGGGGTGGAAGGAGTCA-3'
Bos-5: 5'-CCCCACCGTTGCTAGAGCCCTCT-3'

SSH1: 5'-CGGATCCCTGGGTCTGGGATGTCTGGTTTTTCGTCTAATT-3'
SSH2: 5'-CCTCGAGGGGCTTCGGTTTGGTCGTCCT-3'
SSH3: 5'-CAGCCAGTGTATAGTAGCTTA-3'
SSH5: 5'-GGTCCTTCATTGAATTAGTA-3'

Kex1*: 5'-GAAATGTCCAAGACCTGGGAG-3'
Kex2: 5'-CCCGGTACCGTCGACCCCGATCGTCCGGAAGATGGAGG-3'
KexV: 5'-CTTATTCCGAAGGTTGTTCCG-3'
KexTerm: 5'-GATATATCGGTTTCGGAGTTTTTC-3'

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Deletion der angegebenen Gene verwendet. Die Homologie zu den untranslatierten Genregionen ist unterstrichen.

Δkex2:

ΔKEX1: 5'-GGCCTCGTCACATAATTATAAACTACTAACCCATTATCAGACCAGCTGAAGCTTCG
TACGC-3'
ΔKEX2: 5'-AAAAATGCTATTTTGTAAATTTGAAGCTTTCTGTACATATCGTAGGCCACTAGTGGA
TCTG-3'

Δsec62:

62-shuffle1: 5'-GGAGAAGAGTGGGCTTTTATAATTGCAGTTGAATGCAGTACCAGCTGAAGCTTCG
TACGC-3'
62-shuffle2: 5'-GTATATTAAGCCGGCCGAAATTGAGTAATAATAACCGCTAGGCCACTAGTGGA
TCTG-3'

2.1.6 Kulturmedien

Alle verwendeten Medien wurden 15 min bei 120°C und $1,013 \cdot 10^5$ Pa autoklaviert.

LB-Flüssigmedium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl.

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

YPD-Flüssigmedium: 10 g/l Bacto-Hefeextrakt; 20 g/l Bacto-Pepton; 2% (W/V) Glukose; 40 mg/l Adenin (Hemisulfat).

YPD-Platten: YPD-Flüssigmedium mit 20 g/l Agar.

SD-Flüssigmedium: 6,7 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren; 1% (W/V) 100x Aminosäurelösung(en) (6 g/l L-Leucin, 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% Adeninlösung (1% (W/V) in 0,1 M NaOH); 2% (W/V) Glukose oder Galaktose. Je nach Bedarf wurde mit 1% (V/V) 100x L-Tryptophan-Lösung (4 g/l); 1% (V/V) 100x L-Leucin-Lösung (6 g/l); 1% (V/V) 100x Histidin-Monohydrat-Lösung (2 g/l) und 0,4% Uracil-Lösung (1% (W/V) in 0,1 M NaOH) ergänzt.

SD-Platten: SD-Flüssigmedium mit 20 g/l Agar.

FOA-haltige Platten: 3,35 g/l Stickstoffbase ohne Aminosäuren; 1% (W/V) 100x Aminosäurelösung(en) (6 g/l L-Leucin, 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% Adeninlösung (1% (W/V) in 0,1 M NaOH); 2,5% (V/V) Uracil-Lösung (2 g/l); 2% (W/V) Glukose; 1 g/l FOA; 20g/l Agar. Je nach Bedarf wurde mit 1% (V/V) 100x L-Tryptophan-Lösung (4 g/l); 1% (V/V) L-Leucin-Lösung (6 g/l) und 1% (V/V) 100x Histidin-Monohydrat-Lösung (2 g/l) ergänzt.

Sporulationsplatten: 10 g/l KOAc; 0,25% (W/V) 100x Aminosäurelösung(en) (6 g/l L-Leucin, 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); 0,05% Adeninlösung (1% (W/V) in 0,1 M NaOH); 0,5% (W/V) Glukose; 20 g/l Agar. Je nach Bedarf wurde mit 0,25% (V/V) 100x L-Tryptophan-Lösung (4 g/l); 0,25% (V/V) 100x L-Leucin-Lösung (6 g/l); 0,25% (V/V) 100x Histidin-Monohydrat-Lösung (2 g/l) und 0,1% Uracil-Lösung (1% (W/V) in 0,1 M NaOH) ergänzt.

2.1.7 Bakterienstämme

In der gesamten Arbeit wurde der Bakterienstamm DH5 α F' (Woodcock *et al.*, 1989; Raleigh *et al.*, 1989) verwendet. Er hat den folgenden Genotyp: F' / *endA1 hsdR17* ($r_K^- m_K^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI^r) *relA1* Δ (*lacIZYA-argF*)*U169 deoR* (Φ 80*dlac* Δ (*lacZ*)*M15*).

2.1.8 Hefestämme

| Name | Genotyp | Ausgangsstamm | Quelle |
|-----------|--|---------------|-----------------------------|
| JD 51 | <i>MATa</i> / α <i>ura3-52/ura3-52 leu2-3,-112/leu2-3,-112 his3</i> Δ 200/ <i>his3</i> Δ 200 <i>lys2-801/lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>trp1</i> Δ 63 | - | Dohmen <i>et al.</i> , 1995 |
| JD 52 | <i>MATa</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 | - | Dohmen <i>et al.</i> , 1995 |
| JD 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 | - | Dohmen <i>et al.</i> , 1995 |
| JD 55 | <i>MATa</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>UBR1::HIS3</i> | - | Dohmen <i>et al.</i> , 1995 |
| RSY529 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his4 sec62-1</i> | - | Deshaies und Schekman, 1987 |
| GTY1 | <i>MATa</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801</i> | - | Glen Turner |
| C63D-5 51 | <i>MATa</i> / α <i>ura3-52/ura3-52 leu2-3,-112/leu2-3,-112 his3</i> Δ 200/ <i>his3</i> Δ 200 <i>lys2-801/lys2-801 trp1</i> Δ 63/ <i>trp1</i> Δ 63 <i>SEC63/SEC63::SEC63-C_{UB}-DHA LEU2</i> | JD 51 | diese Arbeit |
| C63R-5 51 | <i>MATa</i> / α <i>ura3-52/ura3-52 leu2-3,-112/leu2-3,-112 his3</i> Δ 200/ <i>his3</i> Δ 200 <i>lys2-801/lys2-801 trp1</i> Δ 63/ <i>trp1</i> Δ 63 <i>SEC63/SEC63::SEC63-C_{UB}-RURA3 LEU2</i> | JD 51 | diese Arbeit |
| C63D-5 a | <i>MATa</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SEC63::SEC63-C_{UB}-DHA LEU2</i> | C63D-5 51 | diese Arbeit |
| C63R-5 a | <i>MATa</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SEC63::SEC63-C_{UB}-RURA3 LEU2</i> | C63R-5 51 | diese Arbeit |
| C63D-55 | <i>MATa</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>UBR1::HIS3 SEC63::SEC63-C_{UB}-RURA3 LEU2</i> | JD 55 | diese Arbeit |
| IB-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{UR}-BOS1 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| AB-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{UA}-BOS1 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| GB-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{UG}-BOS1 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| IB-3 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{UR}-BOS1 HIS3</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| AB-3 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{UA}-BOS1 HIS3</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| GB-3 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{UG}-BOS1 HIS3</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| VIB-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>BOS1::P_{CUP1} N_{VT}-BOS1 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| I61-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SEC61::P_{CUP1} N_{UR}-SEC61 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| A61-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SEC61::P_{CUP1} N_{UA}-SEC61 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| G61-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SEC61::P_{CUP1} N_{UG}-SEC61 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| ISSH-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SSH1::P_{CUP1} N_{UR}-SSH1 TRP1</i> | JD 53 | Wittke <i>et al.</i> , 1999 |
| ASSH-4 53 | <i>MAT</i> α <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3</i> Δ 200 <i>lys2-801 trp1</i> Δ 63 <i>SSH1::P_{CUP1} N_{UA}-SSH1 TRP1</i> | JD 53 | Wittke <i>et al.</i> , 1999 |

| | | | |
|-------------------------|---|-------------------|-----------------------------|
| GSSH-4 53 | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 SSH1::P_{CUP1}N_{UG}-SSH1 TRP1</i> | JD 53 | Wittke <i>et al.</i> , 1999 |
| VISSH-4 53 | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 SSH1::P_{CUP1}N_{VT}-SSH1 TRP1</i> | JD 53 | diese Arbeit |
| <i>Δsec62-51</i> | <i>MATα/αura3-52/ura3-52 leu2-3,-112/leu2-3,-112 his3Δ200/his3Δ200 lys2-801/lys2-801 trp1Δ63 trp1Δ63 SEC62/SEC62::Kan^R</i> | JD51 | diese Arbeit |
| <i>Δsec62-F62</i> | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 SEC62::Kan^R P_{CUP1} FLAG-SEC62 URA3</i> | <i>Δsec62-51</i> | diese Arbeit |
| <i>Δsec62 Sec62-Dha</i> | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 SEC62::Kan^R P_{CUP1} SEC62-DHA TRP1</i> | <i>Δsec62-F62</i> | diese Arbeit |
| <i>Δsec62 ΔC35-Dha</i> | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 SEC62::Kan^R P_{CUP1} ΔC35-DHA TRP1</i> | <i>Δsec62-F62</i> | diese Arbeit |
| <i>Δsec62 ΔN107-Dha</i> | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 SEC62::Kan^R P_{CUP1} ΔN107-DHA TRP1</i> | <i>Δsec62-F62</i> | diese Arbeit |
| CK2R-5 53 | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 KEX2::KEX2-C_{UB}-RURA3 LEU2</i> | JD53 | diese Arbeit |
| <i>Δkex2</i> | <i>MATαura3-52 leu2-3,-112 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ63 KEX2::Kan^R</i> | JD53 | diese Arbeit |

Tab 2.1: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

Bei homolog rekombinierten und durch Sporulation erstellten Stämmen sowie bei Stämmen, die durch Deletion eines Gens entstanden, wurde der jeweilige Ausgangsstamm angegeben.

2.1.9 Vektoren (Plasmide)

Es wurden zur Klonierung und für die Expression in Hefen die Pendelvektoren pRS416 und pRS313-pRS316, die im Zellkern autonom replizieren können und genetisch stabil sind, verwendet (Sikorski und Hieter, 1989). Außerdem wurden zur homologen Rekombination ins Hefegenom (2.2.1.14.2) die Pendelvektoren pRS303-pRS306 eingesetzt (Sikorski und Hieter, 1989). Folgende Plasmide wurden mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt:

| Plasmide | Donor |
|---|-------------|
| <i>SEC63-C_{UB}-DHA-pRS305</i> | N. Johnsson |
| <i>SEC63-C_{UB}-RURA3-pRS305</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{MET25} STE14-C_{UB}-RURA3-pRS315</i> | N. Lewke |
| <i>P_{CUP1} TOM20-C_{UB}-RURA3-pRS315</i> | S. Kind |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-SEC62-pRS314</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-BOS1-pRS303, P_{CUP1} N_{UB}-BOS1-pRS304</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-SEC61-pRS304</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-SSH1-pRS304</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-STE14-pRS314</i> | N. Lewke |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-SED5-pRS314, P_{CUP1} N_{VT}-SED5-pRS314</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-SNCI-pRS314, P_{CUP1} N_{VT}-SNCI-pRS314</i> | N. Johnsson |
| <i>P_{CUP1} N_{UB}-SSO1-pRS314, P_{CUP1} N_{VT}-SSO1-pRS314</i> | N. Johnsson |

| | |
|--|--------------|
| $P_{CUP1} N_{UB-TOM22-pRS314}$ | S. Kind |
| $P_{CUP1} N_{UB-VAM3-pRS314}$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} N_{UB-TPII-HA-pRS314}$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} N_{UB-GUK1-HA-pRS314}$ | J. H. Eckert |
| $P_{CUP1} N_{UB-\Delta C35-DHA-pRS314}$ | M. Dünnwald |
| $P_{CUP1} N_{UB-\Delta C60-DHA-pRS314}$ | M. Dünnwald |
| $P_{CUP1} SEC62-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} \Delta N153/\Delta C60-DHA-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} FLAG-SEC62-pRS316$ | N. Johnsson |
| $P_{GAL1} SEC62-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{GAL1} \Delta C35-DHA-pRS314$ | M. Dünnwald |
| $P_{GAL1} STE14-DHA-pRS314$ | N. Lewke |
| $P_{GAL1} TPII-HA-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{GAL1} FLAG-SEC63_{CT-pRS416}$ | M. Albertsen |
| $P_{CUP1} FLAG-SEC63_{CT-pRS314}$ | M. Albertsen |
| $P_{CUP1} FLAG-SEC63_{CT}\Delta C14-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} FLAG-SEC63_{CT}\Delta C47-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} FLAG-FPRI-63C14-pRS314$ | N. Johnsson |
| $P_{CUP1} FLAG-FPRI-63C47-pRS314$ | N. Johnsson |

Tab 2.2: Plasmide, die dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

Die Bezeichnung der Plasmide sowie der jeweilige Donor sind aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte von $OD_{260} = 1,0$ entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l doppelsträngiger DNA oder 20 ng/ μ l einzelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung diente der Quotient aus den optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm.

2.2.1.2 Extraktion von DNA

Zur Reinigung von Proteinkontaminationen wurde eine wässrige DNA-Lösung zunächst mit einem Volumen Phenol und anschließend mit einem Volumen Chloroform versetzt und geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 1 min bei 14.000 U/min (Tischzentrifuge). Nach der Extraktion wurde die DNA mit EtOH gefällt (2.2.1.3).

2.2.1.3 Präzipitation von DNA

Eine wässrige, niedrig konzentrierte (bis 50 ng/ μ l) DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 5 M KOAc und dem zweifachen Volumen EtOH versetzt und für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Um höher konzentrierte (0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) DNA-Lösungen zu fällen, wurde die Lösung mit 1 Volumen 5 M MgOAc und dem dreifachen Volumen EtOH versetzt und 1 h bei RT präzipitiert. Das Präzipitat wurde für 30 min bei RT und 14.000 U/min (Tischzentrifuge) abzentrifugiert und das DNA-Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen. Nach Trocknen im Vakuumkonzentrator wurde die DNA in dest. Wasser resuspendiert.

2.2.1.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden von der ADIS-Sequenzierungsgruppe des MPI für Züchtungsforschung, Köln durchgeführt.

2.2.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.1.5.1 Restriktionsschnitt von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurden 3-5 μ l Plasmid-DNA (0,5-1 μg) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l behandelt. Den Empfehlungen der Hersteller entsprechend wurden die verschiedenen 10fach konzentrierten Enzym-Reaktionspuffer verwendet. Die Ansätze wurden mit 2-3fachem Enzymüberschuss für mindestens 1 h bei der für die jeweilige Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.1.6) konnte die geschnittene DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Für präparative Zwecke wurde der Klonierungsvektor an den für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen enzymatisch geschnitten, anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.2.1.2) und mit EtOH gefällt (2.2.1.3). Der Vektor und die DNA, die das Insertionsfragment darstellte, wurden mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen behandelt. Durch gelelektrophoretische Auftrennung (2.2.1.6) wurde das DNA-Fragment der erwarteten Größe identifiziert und aus der Agarose eluiert (2.2.1.7).

2.2.1.5.2 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Wenn die Vektor-DNA nur mit einem einzigen Restriktionsenzym behandelt wurde, erfolgte anschließend die Inkubation der DNA mit Alkalischer Phosphatase. Dieses Enzym beseitigt die freien 5'-Phosphatreste und verhindert damit die Religation des Vektors während der Ligationsreaktion (2.2.1.5.4).

2.2.1.5.3 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Enzym

Zur Eliminierung von Restriktionsschnittstellen wurde die Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease geschnitten, deren Erkennungssequenz zerstört werden sollte. Die von dem Enzym erzeugten 5'-überhängenden Enden wurden mit der Klenow-Untereinheit der *E. coli*-Polymerase I aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl, bestehend aus 5 µl geschnittener Plasmid-DNA, 5 µl Restriktionspuffer, 2,5 µl (10 mg/ml) BSA, 1 µl 1mM dNTPs (Roche Diagnostics, Mannheim), 1,5 µl (2 U/µl) Klenow-Enzym (Roche Diagnostics, Mannheim) und 35 µl dest. Wasser. Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert, das Enzym 10 min bei 75°C deaktiviert und die DNA anschließend wie unter 2.2.1.2 beschrieben aufgereinigt. Danach konnte das Plasmid religiert werden (2.2.1.5.4).

2.2.1.5.4 Ligation der DNA-Fragmente

Vektor-DNA und Insertionsfragment wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 ligiert. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl 10x Ligationspuffer, 1 µl *T4*-DNA-Ligase (1 U/µl, Gibco-BRL, Eggenstein) und den Lösungen mit den beiden DNA-Fragmenten; ggf. wurde der Ansatz mit dest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für mindestens 3 h bei RT.

| | | |
|----------------------|--------|-------------------|
| 10x Ligationspuffer: | 500 mM | Tris-HCl, pH 7,5 |
| | 100 mM | DTT |
| | 100 mM | MgCl ₂ |
| | 1 mM | ATP |

2.2.1.6 Agarose Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Zwecke wurden horizontale Agarosegele (1% - 2%ig in 1x TAE, versetzt mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) nach Maniatis *et al.* (1982) angefertigt. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurde die DNA mit Probenpuffer versetzt. Die DNA wurde in 1x TAE bei einer konstanten Spannung von 80-150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker von Gibco-BRL (Eggenstein) verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 320 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

| | | |
|------------------------|--|--|
| 50x TAE, pH 8,0 (1 l): | 242 g 57,1 ml 37,2 g | Tris-Base Tris-Acetat EDTA |
| 5x Probenpuffer: | 0,5 M 50 mM 50% (V/V) 0,05% (W/V) | Tris-HCl, pH 8,0 EDTA Glycerol Bromphenolblau |

2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.1.6) wurde die DNA mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey und Nagel (Schweiz) aus dem Agarosegel eluiert. Die DNA wurde hierbei aus der Gelmatrix gelöst, an eine Anionenaustauschersäule gebunden, mit Waschpuffern aufgereinigt und schließlich in dest. Wasser eluiert.

2.2.1.8 Klonierte Vektoren

Die verwendeten Hefegene wurden in der Regel durch präparative PCR auf genomische Hefe-DNA amplifiziert (2.2.1.12). Das ORF von $\Delta N107/\Delta C35$ wurde von dem Plasmid *P_{CUP1}- $\Delta C35$ -DHA-pRS314* amplifiziert. Die ORF der Gene wurden anschließend entweder direkt in einen Expressionsvektor kloniert oder zunächst in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen, Niederlande) subkloniert. Die für die Expression in Hefe eingesetzten Vektoren sind in Abschnitt 2.1.9 aufgeführt. Eine schematische Darstellung der von den Vektoren aus exprimierten Proteine befindet sich im Anhang dieser Arbeit. In der folgenden Tabelle (Tab 2.3) sind die Namen und Sequenzen der in den PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide, die für die Klonierung eingesetzten Restriktionsendonucleasen und die Bezeichnung der klonierten Plasmide angegeben.

| Name | Sequenz des Oligonukleotids (5'-3') Restriktionsschnittstelle unterstrichen | Restriktions- schnittstelle | Klonierte Konstrukte |
|--------------|---|--------------------------------|--|
| Sec62-x | CCCC <u>GAATTC</u> ATGGTAGCCGAGCAAACA-CAGGAG | <i>EcoRI</i> | <i>P_{GAL1} ΔC76-DHA-pRS314</i> <i>P_{GAL1} sec62-1-DHA-pRS314</i> <i>P_{GAL1} ΔC19-DHA-pRS314</i> <i>P_{GAL1} 0TM-DHA-pRS314</i> <i>P_{GAL1} 1TM-DHA-pRS314</i> |
| Sec62-y | CCCC <u>GTCGACC</u> - CGCCGTTTTGTTCCGGCTTTTTCATTGATG-GCTT | <i>SalI</i> | <i>P_{CUP1} N_{UB}-ΔN107-DHA-pRS314</i> <i>P_{GAL1} sec62-1-DHA-pRS314</i> |
| ΔC76 | CCCC <u>GTCGACC</u> CCACCTCTCAGGATAGCGA-CAGCAAA | <i>SalI</i> | <i>P_{GAL1} ΔC76-DHA-pRS314</i> |
| 0 TM | GGGCCCTCAG <u>GTCGACC</u> CATCCATGTAGG-TTCTAGGGTT | <i>SalI</i> | <i>P_{GAL1} 0TM-DHA-pRS314</i> <i>P_{CUP1} N_{UB}-0TM-DHA-pRS314</i> |
| 1 TM | GGGCCCTCAG <u>GTCGACC</u> CGCGTCTCATG-GAGCGCGG | <i>SalI</i> | <i>P_{GAL1} 1TM-DHA-pRS314</i> |
| ΔN107Bam-ATG | CCCC <u>GGATCC</u> CTGGGTCTGGGGTGATC-CCAGTGAAAAAATTG | <i>BamHI</i> | <i>P_{CUP1} N_{UB}-ΔN107-DHA-pRS314</i> |
| 62N1 | CCCC <u>GAATTC</u> ATGGTGATCCCAGT-GAAAAAATTGCA | <i>EcoRI</i> | <i>P_{GAL1} ΔN107/ΔC35-DHA-pRS314</i> |
| ΔC19 | TCAG <u>GTCGACC</u> CTTTCTTCTTCATTCTTTT | <i>SalI</i> | <i>P_{GAL1} ΔC19-DHA-pRS314</i> <i>P_{CUP1} N_{UB}-ΔC19-DHA-pRS314</i> |
| Kex1 | CCCC <u>GGATCC</u> CATGAAAGTGAGGAAATA-TATT | <i>BamHI</i> | <i>KEX2-C_{UB}-RURA3-pRS305</i> |
| Kex2 | CCCCGTACC <u>GTCGACC</u> CCCGATC-GTCCGGAAGATGGAGG | <i>SalI</i> | <i>KEX2-C_{UB}-RURA3-pRS305</i> |
| RPD1 | GAGCGGAGGCCAGGGTAGGTC | - | <i>P_{GAL1} ΔN107/ΔC35-DHA-pRS314</i> |
| Sec62-neu | <u>GGATCC</u> CTGGGTCTGGGGTAGCCGAG-CAAACA | <i>BamHI</i> | <i>P_{CUP1} N_{UB}-ΔC19-DHA-pRS314</i> <i>P_{CUP1} N_{UB}-0TM-DHA-pRS314</i> |
| Sft1 | CCCCC <u>GGATCC</u> CTGGGGATTCAAATT-CTAGGTATTCTCAGACCG | <i>BamHI</i> | <i>P_{CUP1}-N_{VT}-SFT1-pRS314</i> |
| Sft2 | CCCCC <u>GAATTC</u> GGCCTTAAGAAGAAGAT-TACCAGTC | <i>EcoRI</i> | <i>P_{CUP1}-N_{VT}-SFT1-pRS314</i> |
| Pep12-1 | <u>GGATCC</u> CTGGGGATTCGGAAGACGAATT- | <i>BamHI</i> | <i>P_{CUP1}-N_{UB}-PEP12-pRS314</i> |

| | | | |
|-------------------|--|--------------|----------------------------------|
| | TTTTGGTGG | | |
| Pep12-2 | <u>GAATTC</u> CACTCTTCATTAGGGTATGATG | <i>EcoRI</i> | $P_{CUP1-NUB-PEP12-pRS314}$ |
| SP-62-ATG | CCGTCGGGATC- <u>CATGGATTCTTCTAATGTACC</u> | <i>BamHI</i> | $P_{GALI-SEC62_{SP}-DHA-pRS314}$ |
| SP-62-full | CCGTCCGTCGACCCGCCTTCAGA- GACTTCTTCGACGG | <i>SalI</i> | $P_{GALI-SEC62_{SP}-DHA-pRS314}$ |
| YL-62-ATG | GTGCGAC <u>GAATTC</u> ATGACTGAGAACGTGC CTCAAG | <i>EcoRI</i> | $P_{GALI-SEC62_{YL}-DHA-pRS314}$ |
| YL-62-SalI | GTGCGAC <u>GTCGAC</u> CCGCCCTCGTCGTTAGC ATCCTCCAG | <i>SalI</i> | $P_{GALI-SEC62_{YL}-DHA-pRS314}$ |
| 62HsATG | CGCACG <u>GAATTC</u> ATGGCGGAACGCAGGAG ACACAAG | <i>EcoRI</i> | $P_{GALI-SEC62_{HS}-DHA-pRS314}$ |
| 62HsSalI | CGCACG <u>GTCGAC</u> CCGCCTGATTTTTCATG- TGAAGATTAGG | <i>SalI</i> | $P_{GALI-SEC62_{HS}-DHA-pRS314}$ |

Tab 2.3: Die zur Darstellung der verwendeten Hefegene in den PCRs eingesetzten Oligonukleotide.

Der Name und die Sequenz der Oligonukleotide, mit denen Hefegene amplifiziert wurden, die für die Klonierung eingesetzten Restriktionsendonukleasen (Restriktionsschnittstelle im Oligonukleotid ist unterstrichen) und das jeweilige klonierte Plasmid sind aufgeführt.

Klonierung von $P_{GALI} \Delta C76-DHA-pRS314$

Als Vektor wurde $P_{GALI-pRS314}$, das mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten wurde, verwendet. Als Fragment diente das ebenso geschnittene $\Delta C76-pCR2.1$. Anschließend wurde das *DHA*-Modul mit *SalI* und *ApaI* aus $P_{CUP1} \Delta N107-DHA-pRS314$ geschnitten und hinter das mit denselben Enzymen behandelten $P_{GALI} \Delta C76-pRS314$ gesetzt.

Klonierung von $P_{GALI} 0TM-DHA-pRS314$ und $P_{GALI} 1TM-DHA-pRS314$

Das mit *EcoRI* und *ApaI* geschnittene Plasmid $P_{GALI-pRS314}$ wurde als Vektor verwendet. $0TM-pCR2.1$ bzw. $1TM-pCR2.1$ wurden ebenfalls mit diesen Enzymen behandelt und hinter den P_{GALI} -Promotor kloniert. Anschließend wurde das *DHA*-Modul aus $P_{CUP1} \Delta N107-DHA-pRS314$ über die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *ApaI* ausgeschnitten und hinter $P_{GALI} 0TM-pRS314$ bzw. $P_{GALI} 1TM-pRS314$ kloniert.

Klonierung von $P_{GALI} \Delta C19$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} sec62-1$ -DHA-pRS314 und $P_{GALI} \Delta N107/\Delta C35$ -DHA-pRS314

Als Vektor wurde das mit *EcoRI* und *SalI* geschnittene Plasmid $P_{GALI} SEC62$ -DHA-pRS314 verwendet. $\Delta C19$ bzw. *sec62-1* bzw. $\Delta N107/\Delta C35$ wurden aus *pCR2.1* mit denselben Enzymen ausgeschnitten und an die Stelle des *SEC62* gesetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} SEC62$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta C60$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta N107$ -DHA-pRS314 und $P_{CUP1} \Delta N153$ -DHA-pRS314

Aus dem Vektor $P_{CUP1} SUC59$ -DHA-pRS314 wurde $P_{CUP1} SUC59$ mit den Enzymen *EagI* und *SalI* durch $P_{CUP1} SEC62$, $P_{CUP1} \Delta C60$, $P_{CUP1} \Delta N107$ bzw. $P_{CUP1} \Delta N153$ ersetzt. Diese Fragmente stammten aus den mit *EagI* und *SalI* behandelten Plasmiden $P_{CUP1} SEC62$ -*CUB*-DHA-pRS315, $P_{CUP1} \Delta C60$ -*CUB*-DHA-pRS315, $P_{CUP1} \Delta N107$ -*CUB*-DHA-pRS315 bzw. $P_{CUP1} \Delta N153$ -*CUB*-DHA-pRS315.

Klonierung von $P_{GALI} SEC62$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} \Delta C60$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} \Delta N107$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} \Delta N153$ -DHA-pRS314 und $P_{GALI} \Delta N153/\Delta C60$ -DHA-pRS314

Mit *EcoRI* und *SalI* wurde aus $P_{GALI} \Delta C76$ -DHA-pRS314 das $\Delta C76$ herausgeschnitten und durch *SEC62*, $\Delta C60$, $\Delta N107$, $\Delta N153$ und $\Delta N153/\Delta C60$ ersetzt. Die Fragmente stammten aus den mit *EcoRI* und *SalI* behandelten Plasmiden $P_{CUP1} SEC62$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta C60$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta N107$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta N153$ -DHA-pRS314 und $P_{CUP1} \Delta N153/\Delta C60$ -DHA-pRS314.

Klonierung von $P_{CUP1} \Delta C19$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta C76$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} \Delta N107/\Delta C35$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} 0TM$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} 1TM$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} sec62-1$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} SEC62_{YL}$ -DHA-pRS314, $P_{CUP1} SEC62_{SP}$ -DHA-pRS314 und $P_{CUP1} SEC62_{HS}$ -DHA-pRS314

$P_{CUP1} SEC62$ -DHA-pRS314 wurde mit *EcoRI* und *SalI* behandelt. $P_{GALI} \Delta C19$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} \Delta C76$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} \Delta N107/\Delta C35$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} 0TM$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} 1TM$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} sec62-1$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} SEC62_{YL}$ -DHA-pRS314, $P_{GALI} SEC62_{SP}$ -DHA-pRS314 und $P_{GALI} SEC62_{HS}$ -DHA-pRS314 wurden mit derselben Enzymkombination behandelt und an die Stelle des *SEC62* eingesetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} \Delta C35\text{-DHA-pRS314}$

$P_{CUP1} SEC62\text{-DHA-pRS314}$ wurde mit *Bam*HI und *Sal*I behandelt. $P_{GALI} \Delta C35\text{-DHA-pRS314}$ wurde mit derselben Enzymkombination behandelt und an die Stelle des *SEC62* eingesetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} SEC62\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta C19\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta C35\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta C60\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta C76\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta N107\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta N153\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta N107/\Delta C35\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} \Delta N153/\Delta C60\text{-DHA-pRS316}$, $P_{CUP1} 0TM\text{-DHA-pRS316}$ und $P_{CUP1} 1TM\text{-DHA-pRS316}$

Der Vektor *pRS316* wurde mit den Enzymen *Sac*II und *Hind*III geschnitten und die ORF der Fusionsgene wurden vom Vektor *pRS314* in den Vektor *pRS316* eingesetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} N_{VI}\text{-SFT1-pRS314}$

Im als Vektor mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen Plasmid $N_{UI}\text{-SSO1-pRS314}$ wurde das *SSO1* durch das aus *SFT1-pCR2.1* mit denselben Enzymen entnommene *SFT1* ersetzt. Schließlich wurde im resultierenden Plasmid $P_{CUP1} N_{UI}\text{-SFT1-pRS314}$ das N_{UI} durch N_{VI} aus dem Vektor $P_{CUP1} N_{VI}\text{-STE14-pRS314}$ ersetzt. Beide Plasmide wurden hierfür mit *Sac*II und *Bam*HI behandelt.

Klonierung von $P_{CUP1} N_{VI}\text{-SEC62-pRS314}$, $P_{CUP1} N_{VI}\text{-BOS1-pRS314}$ und $P_{CUP1} N_{VI}\text{-SSH1-pRS314}$

In dem Vektor $P_{CUP1} N_{VI}\text{-SED5-pRS314}$ wurde durch die Enzymschnittstellen *Bam*HI und *Apa*I das *SED5* durch *SEC62*, *BOS1* bzw. *SSH1* ersetzt. Die Fragmente stammten aus $P_{CUP1} N_{UB}\text{-SEC62-pRS314}$, $P_{CUP1} N_{UB}\text{-BOS1-pRS304}$ bzw. $P_{CUP1} N_{UB}\text{-SSH1-pRS304}$.

Klonierung von $P_{CUP1} N_{UB}\text{-PEP12-pRS314}$

Im als Vektor mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen Plasmid $N_{UB}\text{-SSO1-pRS314}$ wurde das *SSO1* durch das aus *PEP12-pCR2.1* mit denselben Enzymen entnommene *PEP12* ersetzt.

Klonierung von $KEX2\text{-C}_{UB}\text{-RURA3-pRS305}$

KEX2 wurde aus *pCR2.1* mit den Enzymen *Cla*I und *Sal*I ausgeschnitten und an die Stelle des *STE14* aus $P_{CUP1} STE14\text{-C}_{UB}\text{-RURA3-pRS314}$ gesetzt, das mit denselben Enzymen behandelt wurde. Anschließend wurde das Fragment *KEX2-C_{UB}-RURA3* über die Schnittstelle *Hind*III in den Vektor *pRS305* gesetzt.

Klonierung von $P_{GALI} SEC62_{SP}\text{-DHA-pRS314}$

Die Plasmide $P_{GALI} 0TM\text{-DHA-pRS314}$ und $SEC62_{SP}\text{-pCR2.1}$ wurden mit *Bam*HI und *Sal*I geschnitten. *0TM* wurde durch $SEC62_{SP}$ ersetzt.

Klonierung von $P_{GALI} SEC62_{YL}\text{-DHA-pRS314}$ und $P_{GALI} SEC62_{HS}\text{-DHA-pRS314}$

Das als Vektor verwendete Plasmid $P_{GALI} \Delta N107\text{-DHA-pRS314}$ und $SEC62_{YL}\text{-pCR2.1}$ bzw. $SEC62_{HS}\text{-pCR2.1}$ wurden mit *Eco*RI und *Sal*I geschnitten. $\Delta N107$ wurde durch $SEC62_{YL}$ bzw. $SEC62_{HS}$ ersetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} N_{UB}\text{-}\Delta C19\text{-DHA-pRS314}$

$P_{CUP1} N_{UB}\text{-}SNC1\text{-pRS313}$ wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I geschnitten. Das *SNC1* wurde durch $\Delta C19$ aus $\Delta C19\text{-pCR2.1}$ ersetzt, das mit derselben Enzymkombination behandelt wurde. Schließlich wurde im Vektor $P_{CUP1} \Delta N153\text{-DHA-pRS314}$ das $P_{CUP1} \Delta N153$ mit der Enzymkombination *Eag*I und *Sal*I durch $P_{CUP1} N_{UB}\text{-}\Delta C19$ ersetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} N_{UB}\text{-}\Delta N107\text{-DHA-pRS314}$ und $P_{CUP1} N_{UB}\text{-}0TM\text{-DHA-pRS314}$

$P_{CUP1} N_{UB}\text{-}SNC1\text{-pRS313}$ wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I geschnitten. Das *SNC1* wurde durch $\Delta N107$ aus $\Delta N107\text{-pCR2.1}$ bzw. *0TM* aus $0TM\text{-pCR2.1}$ ersetzt, die mit derselben Enzymkombination behandelt wurden. Anschließend wurde aus dem Plasmid $P_{CUP1} \Delta N153\text{-DHA-pRS314}$ das mit *Sal*I und *Apa*I herausgenommene *DHA* hinter $P_{CUP1} N_{UB}\text{-}\Delta N107\text{-pRS314}$ bzw. $P_{CUP1} N_{UB}\text{-}0TM\text{-pRS314}$ gesetzt.

Klonierung von $P_{CUP1} N_{UF}\text{-}GUK1\text{-DHA-pRS314}$ und $P_{CUP1} N_{UF}\text{-}GUK1\text{-DHA-pRS313}$

Die Plasmide $P_{CUP1} N_{UA}\text{-}0TM\text{-DHA-pRS314}$ und $P_{CUP1} N_{UF}\text{-}GUK1\text{-HA-pRS314}$ wurden mit den Enzymen *Eag*I und *Sal*I behandelt. Das $P_{CUP1} N_{UA}\text{-}0TM$ wurde durch $P_{CUP1}\text{-}N_{UF}\text{-}GUK1$ ersetzt. Anschließend wurde $P_{CUP1} N_{UF}\text{-}GUK1\text{-DHA-pRS314}$ mit *Sac*II und *Apa*I auf *pRS313* kloniert.

2.2.1.9 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine 3 ml ü/N-Kultur von *E. coli*-Zellen (2.1.7) wurde auf ein Volumen von 500 ml LB-Flüssigmedium verdünnt. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer dreißigminütigen Abkühlung unter Schütteln auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3.500 U/min (Beckman J2-21, Rotor JA-14) bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem Tfb1-Puffer auf Eis resuspendiert, er-

neut abzentrifugiert, in 20 ml eiskaltem Tfb2-Puffer aufgenommen und in 200 µl-Aliquots aufgeteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bei -70°C gelagert.

| | | | |
|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
| Tfb1-Puffer: | 30 mM KOAc | Tfb2-Puffer: | 12,5 mM Na-MOPS, pH 7 |
| | 50 mM MnCl ₂ | | 12,5 mM KCl |
| | 100 mM KCl | | 95 mM CaCl ₂ |
| | 10 mM CaCl ₂ | | 18,75% (V/V) Glycerol |
| | 15% (V/V) Glycerol | | |

2.2.1.10 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Ein 200 µl-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (2.2.1.9) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl Plasmid-DNA-Lösung oder 4 µl eines Ligationsansatzes (2.2.1.5.4) versetzt. Nach einer zwanzigminütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen einem fünfminütigen Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt, mit 1 ml LB-Flüssigmedium (2.1.6) versetzt und bei 37°C für 1 h im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf eine LB-Platte mit Ampicillin (2.1.6) ausplattiert und ü/N bei 37°C inkubiert.

2.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

1,5 ml einer ü/N-Kultur transformierter Bakterien wurden 5 min bei 6.000 U/min (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl STETL-Lösung und 10 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurden die Proben für 45 s bei 100°C erhitzt. Das Zellpellet wurde 15 min bei 14.000 U/min (s. o.) abzentrifugiert und mit einem Zahnstocher entfernt. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von einem Volumenanteil Isopropanol bei RT durch zwanzigminütiges Zentrifugieren bei 14.000 U/min (s. o.) gefällt. Nach Waschen mit 70%igem EtOH wurde die DNA vakuumgetrocknet und in 60 µl TE-Puffer aufgenommen.

| | | |
|---------------|----------|------------------|
| STETL-Lösung: | 8% (W/V) | Saccharose |
| | 5% (V/V) | Triton X-100 |
| | 50 mM | EDTA |
| | 50 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| TE-Puffer: | 10 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1 mM | EDTA, pH 8,0 |

2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) wurde sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke eingesetzt. Im analytischen Maßstab diente sie zur Kontrolle der homologen Rekombination von Plasmid-DNA ins Hefegenom (2.2.1.14.2) oder einer korrekt erfolgten Gendeletion (2.2.1.15). Die PCR konnte direkt mit Hefekolonien oder alternativ mit genomischer DNA (2.2.1.16) aus den zu analysierenden Hefezellen durchgeführt werden. Im präparativen Maßstab wurde die PCR-Methode angewendet, um Hefegene aus genomischer DNA zu vervielfältigen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 100 µl in einem Tri Block PCR-System von Biometra (Göttingen) durchgeführt. Der Ansatz für eine PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1 pg genomische Hefe-DNA als Matrize; 10 µl 10x *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer mit MgCl₂ (1,5 mM); 2 µl dNTP-Mischung (je 10 mM); je 1 µl vorwärts und revers gerichteter Oligonukleotid-Primer (100 pmol/µl); 1 µl *Taq*-DNA-Polymerase (1 U/µl).

Folgende Reaktionszyklen wurden durchlaufen:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA für 30 s bei 95°C.
2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an ihre komplementären DNA-Sequenzen für 30 s bei 55°C.
3. DNA-Synthese durch die *Taq*-DNA-Polymerase für 2 min bei 72°C.

Die Schritte 1. bis 3. durchliefen 35 Zyklen. Die Analyse des amplifizierten DNA-Abschnitts erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.6).

Wenn statt genomischer DNA Hefekolonien für die PCR verwendet wurden, wurde der Reaktionsansatz zunächst für 15 min bei 98°C in der PCR-Maschine erhitzt und erst anschließend *Taq*-DNA-Polymerase hinzugegeben.

Für eine präparative PCR wurde anstelle der *Taq*-DNA-Polymerase eine DNA-Polymerase mit Korrekturaktivität eingesetzt (PWO-Polymerase, 5 U/µl). Außerdem wurden die oben aufgeführten Zyklen nur 25x durchlaufen.

2.2.1.13 Herstellung kompetenter Hefen

Zur Herstellung kompetenter Hefen wurde die Lithiumacetat-Methode nach Gietz *et al.* (1992) angewendet. Eine 30 ml Vorkultur von Hefezellen in YPD- bzw. selektivem SD-Flüssigmedium (2.1.6) wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,2 - 0,3 in 300 ml desselben Flüssigmediums verdünnt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 - 1 unter Schütteln weiter inkubiert. Nach der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation bei 3.500 U/min (Beckman J2-21, Rotor: JA14)

bei RT und Waschen in 20 ml sterilem dest. Wasser wurde das Zellpellet in 1,5 ml eiskaltem TL1-Puffer auf Eis resuspendiert und in Aliquots von 100 µl aufgeteilt. Die Zellen konnten sofort zur Transformation (2.2.1.14) verwendet oder bei -70°C gelagert werden.

| | | |
|-------------|--------|----------------|
| TL1-Puffer: | 0,5 ml | 10x TE, pH 8,0 |
| | 0,5 ml | 1 M LiOAc |
| | 4 ml | dest. Wasser |

2.2.1.14 Transformation kompetenter Hefen mit Plasmid-DNA

2.2.1.14.1 Transformation von Hefen mit autonom replizierenden Plasmiden

Ein 100 µl-Aliquot kompetenter Hefezellen (2.2.1.13) wurde mit 10 µl Träger-DNA-Lösung, 1 µg Plasmid-DNA und 600 µl TL2-Puffer versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation der Zellen unter Schütteln (Eppendorf Mixer 5432) bei RT erfolgte ein zehnminütiger Hitzeschock bei 42°C. Bei temperatursensitiven Hefen wurde die Temperatur und die Dauer des Hitzeschocks herabgesetzt. Zuletzt wurden die Zellen ca. 10 s bei 10.000 U/min (Tischzentrifuge) pelletiert und in 100 µl 1x TE, pH 8,0 resuspendiert. Die Hefezellen wurden auf für die jeweiligen Plasmide selektive SD-Platten ausplattiert und bei der für den jeweiligen Stamm optimalen Wachstumstemperatur inkubiert.

| | | |
|-------------|--------|-------------------|
| TL2-Puffer: | 0,5 ml | 10x TE, pH 8,0 |
| | 0,5 ml | 1 M LiOAc |
| | 4 ml | 50%iges (W/W) PEG |

Träger-DNA-Lösung: 10 mg/ml DNA-Lösung aus Lachshoden (Sigma, Deisenhofen) wurden durch Sonifikation geschert. Diese Lösung wurde kurz vor dem Gebrauch für 10 min durch Aufkochen denaturiert.

2.2.1.14.2 Integrative Transformation von Hefen (Hinnen et al., 1978)

Um Plasmide homolog in das Hefegenom zu integrieren, wurde die Plasmid-DNA vor der Transformation im Hefegenom-Abschnitt durch eine Restriktionsendonuklease einmal geschnitten (2.2.1.5.1), so dass der Vektor linearisieren konnte. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Restriktion wurden 3 µl des Restriktionsansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.1.6). Der verbleibende Restriktionsansatz wurde vollständig für die Transformation eingesetzt. Parallel wurde ein Kontrollansatz mit identischer, aber ungeschnittener Plasmid-DNA transformiert. Ansonsten wurde wie unter 2.2.1.14.1 beschrieben transformiert.

- **Homologe Rekombination von *SEC63-C_{UB}-DHA-pRS305* und *SEC63-C_{UB}-RURA3-pRS305***

SEC63-C_{UB}-DHA-pRS305 und *SEC63-C_{UB}-RURA3-pRS305* wurden über die Restriktionsschnittstelle *PstI* in das Hefegenom integriert. Das nach dem Rekombinationsereignis neben dem modifizierten Gen entstandene, am 5'-Ende verkürzte *SEC63*-Teilstück hatte noch eine Länge von 444 bp (native Genlänge: 1989 bp).

- **Homologe Rekombination von *Kex2-C_{UB}-RURA3-pRS305***

Kex2-C_{UB}-RURA3-pRS305 wurde über die Restriktionsschnittstelle *AvrII* in das Hefegenom integriert. Das nach dem Rekombinationsereignis neben dem modifizierten Gen entstandene, am 5'-Ende verkürzte *KEX2*-Teilstück hatte noch eine Länge von 923 bp (native Genlänge: 2442 bp).

- **Homologe Rekombination von *P_{CUP1} N_{UB}-SEC61-pRS304***

P_{CUP1} N_{UB}-SEC61-pRS304 wurde über die Restriktionsschnittstelle *StuI* in das Hefegenom integriert. Das nach dem Rekombinationsereignis neben dem modifizierten Gen entstandene, am 3'-Ende verkürzte *SEC61*-Teilstück hatte noch eine Länge von 875 bp (native Genlänge: 1440 bp).

- **Homologe Rekombination von *P_{CUP1} N_{VT}-SSH1-pRS304***

P_{CUP1} N_{VT}-SSH1-pRS304 wurde über die Restriktionsschnittstelle *EcoRI* in das Hefegenom integriert. Das nach dem Rekombinationsereignis neben dem modifizierten Gen entstandene, am 3'-Ende verkürzte *SSH1*-Teilstück hatte noch eine Länge von 638 bp (native Genlänge: 1470 bp).

- **Homologe Rekombination von *P_{CUP1} N_{UB}-BOS1-pRS303* und *P_{CUP1} N_{UB}-BOS1-pRS304***

P_{CUP1} N_{UB}-BOS1-pRS303 und *P_{CUP1} N_{UB}-BOS1-pRS304* wurden über die Restriktionsschnittstelle *EcoRI* in das Hefegenom integriert. Das nach dem Rekombinationsereignis neben dem modifizierten Gen entstandene, am 3'-Ende verkürzte *BOS1*-Teilstück hatte noch eine Länge von 232 bp (native Genlänge: 732 bp).

2.2.1.15 Deletion eines Gens im Hefegenom

Zur Deletion von Hefegenen wurde nach Güldener *et al.* (1996) ein sogenanntes KanMX-Modul verwendet. Es besteht aus dem dominanten Kanamycin-Resistenzgen aus *E. coli* (Kan^R), dessen Expression durch den *TEF*-Promotor und -Terminator aus *Ashbya gossypii* kontrolliert wird. Dieses Expressionsmodul wird von zwei LoxP-Sequenzen flankiert (loxP-KanMX-loxP) und befindet sich auf dem Vektor pUG6.

Zur Gendeletion wurde mit Hilfe einer präparativen PCR-Reaktion (2.2.1.12) ein PCR-Fragment erzeugt, welches sich aus der loxP-KanMX-loxP-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des zu deletierenden Gens zusammensetzte. Durch homologe Rekombinationsereignisse 5' und 3' des offenen Leserasters des zu deletierenden Gens wurde dieses PCR-Fragment in das Hefegenom integriert. Das gesamte offene Leseraster des Gens wurde so durch loxP-KanMX-loxP ersetzt. Für die Hefetransformation (2.2.1.14) wurden 15 µl des PCR-Produktes verwendet und die Transformanten wurden zur Selektion auf YPD-Platten mit Geneticin (2.1.6) ausplattiert.



Abb 2.1: Schematische Darstellung der Gendeletion durch homologe Rekombination des KanMX-Moduls an den Genlokus des zu deletierenden Gens.

Ein PCR-Produkt bestehend aus KanMX-Modul, flankiert mit loxP-Sequenzen und mit Sequenzen der 3'- und 5'-untranslatierten Genregionen (5'-UTR und 3'-UTR) wird durch homologe Rekombination (X) in das Hefegenom integriert. Das Hefegen wird durch loxP-KanMX-loxP ersetzt und die Hefezellen sind Kanamycin-resistent (Kan^R).

2.2.1.16 Präparation von genomischer Hefe-DNA

Eine 10 ml-Hefekultur wurde bei der für den jeweiligen Stamm optimalen Wachstumstemperatur so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 2,0 - 3,0 erreicht war. Die Hefezellen wurden nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 3.500 U/min (Haereus Varifuge 3.2 RS) bei RT geerntet und in 0,5 ml dest. Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge) wurde das Zellpellet in 0,2 ml Lysispuffer (TSSTE) resuspendiert und auf 300 µl Glasperlen (Sigma, Deisenhofen; 425-600 µm, säuregewaschen) gegeben. Nach Zusatz von 200 µl Phenol wurden die Hefen

durch dreiminütiges Schütteln aufgeschlossen, mit 200 µl TE-Puffer (pH 8,0) versetzt und bei 14.000 U/min in einer Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige, DNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit 1 ml EtOH versetzt und 2 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 400 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Um RNA zu beseitigen wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C mit 8 µl 1 mg/ml RNase (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Nach einer weiteren Ethanol-fällung (2.2.1.3) wurde die genomische DNA in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

| | | |
|----------------------|----------|------------------|
| Lysispuffer (TSSTE): | 2% (V/V) | Triton X-100 |
| | 1% (W/V) | SDS |
| | 100 mM | NaCl |
| | 10 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1 mM | EDTA |
| TE-Puffer, pH 8,0: | 10 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1 mM | EDTA, pH 8,0 |

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Hefen

Hefevorkulturen wurden in 10 ml des entsprechenden Flüssigmediums (2.1.6) auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 1 - 1,2 bei der für die Zellen optimalen Wachstumstemperatur inkubiert. Die Hefezellen wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 3.500 U/min (Haereus Varifuge 3.2 RS) bei 10°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 150 µl eiskaltem Lysispuffer, versetzt mit 1/40 Volumen 2 M NEM in DMF und 4,1 mM PMSF in EtOH, resuspendiert und auf 150-200 µl vorgekühlte Glasperlen (Sigma, Deisenhofen; 425-600 µm, säuregewaschen) gegeben. Anschließend wurden die Hefezellen durch sechsmaliges starkes Schütteln von je 30 s, das von einer jeweils dreißigsekündigen Abkühlung auf Eis unterbrochen wurde, aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 14.000 U/min (Eppendorf Centrifuge 5417 R) bei 4°C wurden 70 µl des Überstandes in ein gleiches Volumen 2x SDS-Probenpuffer überführt und die Ansätze sofort für 3 min bei 100°C erhitzt.

| | | |
|--------------|----------|---------------|
| Lysispuffer: | 50 mM | HEPES, pH 7,5 |
| | 150 mM | NaCl |
| | 2,5 mM | EDTA |
| | 1% (V/V) | TritonX-100 |

| | | |
|----------------------|-------------|--------------------------|
| 2x 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 |

2.2.2.2 Bestimmung der Gesamteinkonzentration nach Bradford

Das Bradford-Reagenz ermöglicht die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 595 nm (Bradford, 1976).

Es wurden 5 μ l des Überstandes der Proteinextrakte (2.2.2.1) abgenommen und mit 200 μ l Wasser und 800 μ l Bradford-Reagenz (Amresco, USA) versetzt. Nach 15-30minütiger Inkubationszeit wurde die OD₅₉₅ im Vergleich zu einem Leerwert bestimmt. Jeder Proteinextrakt wurde zweifach gemessen und das arithmetische Mittel errechnet. Hieraus ergab sich das relative Volumen der auf ein SDS-Gel gemeinsam aufzutragenden Proben.

2.2.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die 12,5%ige SDS-PAGE erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970). Es wurde das Gelsystem von Hoefer (USA) verwendet. Die Abmessungen der Gele betragen 18 cm x 16 cm x 0,75 mm. Die Proteinextrakte (2.2.2.1) wurden bis zur vollständigen Denaturierung bei 100°C erhitzt und gemeinsam mit einem Proteingrößenmarker (2.1.4) aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte entweder für ca. 5 h bei einer konstanten Spannung von 220 V oder \bar{u}/N bei einer konstanten Spannung von 50 V.

| | | |
|-----------------------|--------------|------------------------------|
| Trenngel: | 12,5%ig | |
| | 5,0 ml | dest. Wasser |
| | 6,0 ml | 30%ige (W/V) Acrylamidlösung |
| | 3,8 ml | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 |
| | 150 μ l | 10%iges (W/V) SDS |
| | 150 μ l | 10%iges (W/V) APS |
| | 30 μ l | TEMED |
| Sammelgel: | 5,8 ml | dest. Wasser |
| | 1,2 ml | 30%ige (W/V) Acrylamidlösung |
| | 1 ml | 1 M Tris-HCl, pH 6,8 |
| | 80 μ l | 10%iges (W/V) SDS |
| | 80 μ l | 10%iges (W/V) APS |
| | 15 μ l | TEMED |
| Elektrophoresepuffer: | 192 mM | Glycin |
| | 24,8 mM | Tris-Base |
| | 3,5 mM (W/V) | SDS |

2.2.2.4 Westernblotanalyse

Die in der SDS-PAGE (2.2.2.3) aufgetrennten Proteine wurden in einem Semiphor-Blottinggerät (Hoefler, USA) nach dem halbtrockenen Elektrotransfer-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Transfer nach Kyhse-Andersen, 1984). Die Nitrozellulosemembran wurde vor Verwendung kurz in dest. Wasser gelegt und danach in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wurde auf die Membran aufgelegt und beides zwischen je drei Lagen Transferpuffer-getränktes 3 MM Papier angeordnet. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 200 mA. Die Güte des Transfers und der Proteinextrakte konnte anschließend durch reversible Ponceau-S-Färbung (Salinovich und Montelaro, 1986) der Membran überprüft werden.

Die Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde zur Absättigung der freien Protein-Bindungsstellen zunächst für mindestens 1 h bei RT, meist ü/N bei 4°C, in Blockpuffer geschüttelt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Membran mit dem ersten Antikörper (2.1.2), der in einer Verdünnung von 1 : 4.000 (α -Sec62p; α -Sec61p), 1:5.000 (α -Flag) oder 1: 10.000 (α -ha) in Blocklösung auf die Membran gegeben wurde. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT wurde die Membran mehrmals mit Waschpuffer HBST für insgesamt 1 h gewaschen. Danach erfolgte die Bindung des zweiten Antikörpers (2.1.2), der 1:10.000 verdünnt wurde, ebenfalls für 1 h in Blocklösung. Nach erneutem Waschen der Membran (s. o.) erfolgte der Nachweis der an die Membran gebundenen Proteine mit Hilfe des ECL-Immundefektionsverfahrens von Pierce (USA) nach Herstellerangaben. Die Detektion der Lichtemission erfolgte durch einen Lumi-Imager (Roche Diagnostics, Mannheim). Nach Ablösung des ersten und zweiten Antikörpers („Strippen“) und mehrmaligem Waschen in Wasser konnte die Membran erneut mit Antikörpern behandelt werden. Das Strippen erfolgte für 1 h bei 50°C in Stripping-Puffer.

| | | |
|-----------------------|-------------|---|
| Transferpuffer (1 l): | 2,9 g | Tris-Base |
| | 14,3 g | Glycin |
| | 200 ml | Methanol |
| | 5 ml | 10%iges (W/V) SDS |
| Ponceau-S-Lösung: | 40% (V/V) | Methanol |
| | 15% (V/V) | Eisessig |
| | 0,25% (W/V) | Ponceau-S |
| Waschpuffer HBST: | 150 mM | NaCl |
| | 20 mM | HEPES, pH 7,5 (oder 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) |
| | 0,2% (V/V) | Tween 20 |
| Blockpuffer: | 5% (W/V) | Magermilchpulver in Waschpuffer HBST |

| | | |
|-------------------|----------|--------------------------|
| Stripping-Puffer: | 62,5 mM | Tris-HCl, pH 6,8 |
| | 100 mM | β -Mercaptoethanol |
| | 2% (W/V) | SDS |

2.2.2.5 Koimmunpräzipitation

2.2.2.5.1 Koimmunpräzipitation löslicher Proteine

Eine 30 ml Vorkultur von Hefezellen in selektivem Flüssigmedium (2.1.6) wurde auf eine OD_{600} von 0,3 in 300 ml desselben Flüssigmediums verdünnt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 - 1 unter Schütteln weiter inkubiert. Nach der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation bei 3.500 U/min (Beckman J2-21, Rotor: JA-14) bei RT und Waschen in 20 ml sterilem dest. Wasser wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem DB-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension auf 3 ml eisgekühlte Glasperlen (Sigma, Deisenhofen; 425-600 μ m, säuregewaschen) gegeben. Die Hefezellen wurden durch fünfzehnmaliges starkes Schütteln von je 30 s, das von einer jeweils dreißigsekündigen Abkühlung auf Eis unterbrochen wurde, aufgeschlossen und mit 1 ml DB-Puffer versetzt. Durch eine zweimalige fünfminütige Zentrifugation bei 500 g und 2°C (Beckman J2-21, Rotor: JA-20) wurden Zelltrümmer und unaufgebrochene Zellen abzentrifugiert. Die vereinten Protein-haltigen Überstände wurden für 10 min bei 14.000 U/min (Eppendorf Centrifuge 5417 R) bei 4°C durch Zentrifugation geklärt. Anschließend wurden die Antikörper, die das Protein von Interesse präzipitieren sollten, zu den Proteinextrakten gegeben (15 μ l anti-ha-Antikörper gebundene Agaroseperlen bzw. 5 μ l anti-Flag-Antikörper). Die mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen versetzten Extrakte wurden ü/N bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die mit anti-Flag-Antikörper behandelten Extrakte wurden 1 h auf Eis inkubiert, mit 30 μ l ProteinA-Agarose-Perlen versetzt und erst dann ü/N bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Agaroseperlen und die daran gebundenen Proteine wurden schließlich durch Zentrifugation (5 s bei 10.000 U/min, Tischzentrifuge) präzipitiert, viermal mit DB-Puffer gewaschen, in 2x SDS-Probenpuffer überführt und für 3 min bei 100°C erhitzt. Nach SDS-PAGE (2.2.2.3) wurde die Westernblotanalyse (2.2.2.4) mit den Antikörpern durchgeführt, die gegen mögliche kopräzipitierte Proteine gerichtet waren.

| | | |
|------------|---------------------|--------------------|
| DB-Puffer: | 50 mM | HEPES-NaOH, pH 7,5 |
| | 50 mM | NaCl |
| | 1 mM | EDTA |
| | 10 mM | DTT |
| | 1 mM | PMSF |
| | 10 μ g/ μ l | Leupeptin |
| | 5 μ g/ μ l | Chymostatin |

2.2.2.5.2 Koimmunpräzipitation von Membranproteinen

Eine 30 ml Vorkultur von Hefezellen in selektivem Flüssigmedium (2.1.6) wurde auf eine OD_{600} von 0,3 in 300 ml desselben Flüssigmediums verdünnt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 - 1 unter Schütteln weiter inkubiert. Nach der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation bei 3.500 U/min (Beckman J2-21, Rotor: JA-14) bei RT und Waschen in 20 ml sterilem dest. Wasser wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Puffer 1 resuspendiert und die Zellsuspension auf 3 ml eisgekühlte Glasperlen (Sigma, Deisenhofen; 425-600 μm , säuregewaschen) gegeben. Die Hefezellen wurden durch fünfzehnmaliges starkes Schütteln von je 30 s, das von einer jeweils dreißigsekündigen Abkühlung auf Eis unterbrochen wurde, aufgeschlossen und mit 1 ml Puffer 1 versetzt. Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 g und 2°C (Beckman J2-21, Rotor: JA-20) wurden Zelltrümmer, unaufgebrochene Zellen und Mitochondrien-Membranen abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Zellmembranen wurden anschließend für 35 min bei 25.000 U/min (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor Ti55) bei 2°C durch Zentrifugation pelletiert und in einer Endkonzentration von 1 eq/ μl ($OD_{600} = 1$ entspricht 1 eq/ μl) in Puffer 2 aliquotiert. Die Membranäquivalente wurden in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Für eine Koimmunpräzipitation wurden 800 Membranäquivalente eingesetzt. Die Mikrosomen wurden auf Eis aufgetaut, mit Saponin-haltigem Puffer auf 5 ml aufgefüllt und für 80 min bei 2°C und 44.000 U/min (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor Ti55) abzentrifugiert. Das Membranpellet wurde in Digitonin-haltigem Puffer resuspendiert und 90 min bei 2°C und 92.000 U/min (Beckman Ultra-Tischzentrifuge TL-100, Rotor TLA-100.1) extrahiert. Nach Wiederholung der Digitonin-Extraktion wurde der resultierende, vereinte Digitonin-Extrakt, der die Membranproteine enthielt, zur Koimmunpräzipitation eingesetzt. Es wurden 30 μl anti-ha-Antikörper gebundene Agaroseperlen zu den Digitonin-Extrakten gegeben und die Ansätze ü/N bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Agaroseperlen und die daran gebundenen Proteine wurden schließlich durch Zentrifugation (5 s bei 10.000 U/min, Tischzentrifuge) präzipitiert, viermal mit Digitonin-haltigem Puffer gewaschen, in 2x SDS-Probenpuffer überführt und für 3 min bei 100°C erhitzt. Nach SDS-PAGE (2.2.2.3) wurde die Westernblotanalyse (2.2.2.4) mit anti-Sec61p-Antikörpern durchgeführt.

| | | |
|----------------------------|-------------|-------------------|
| Puffer 1: | 250 mM | HEPES-KOH, pH 7,5 |
| | 25 mM | KOAc |
| | 5 mM | MgOAc |
| | 5 mM | EDTA |
| | 5% (V/V) | Glycerol |
| | 1 mM | PMSF |
| | 10 mM | DTT |
| | 10 µg/ml | Leupeptin |
| | 5 µg/ml | Chymostatin |
| Puffer 2: | 50 mM | HEPES-KOH, pH 7,5 |
| | 10% (V/V) | Glycerol |
| | 2 mM | DTT |
| | 1 µg/ml | Leupeptin |
| | 0,5 µg/ml | Chymostatin |
| Saponin-haltiger Puffer: | 50 mM | HEPES-KOH, pH 7,5 |
| | 800 mM | KOAc |
| | 16 mM | MgOAc |
| | 10% (V/V) | Glycerol |
| | 2,5% (W/V) | Saponin |
| | 7 mM | β-Mercaptoethanol |
| | 5 µg/ml | Leupeptin |
| 2,5 µg/ml | Chymostatin | |
| Digitonin-haltiger Puffer: | 50 mM | HEPES-KOH, pH 7,5 |
| | 400 mM | KOAc |
| | 8 mM | MgOAc |
| | 10% (V/V) | Glycerol |
| | 3% (W/V) | Digitonin |
| | 7 mM | β-Mercaptoethanol |
| | 10 µg/ml | Leupeptin |
| | 5 µg/ml | Chymostatin |

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Physiologischer Wachstumstest (Interaktionstest)

2 ml-Hefekulturen wurden ü/N bis zur stationären Phase in für die Plasmide selektivem, Uracil-haltigem Flüssigmedium (2.1.6) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit sterilem, dest. Wasser so verdünnt, dass sich in einem Volumen von 4 µl eine definierte Zellzahl befand. Die Hefen wurden auf Nährplatten aufgetropft, die für die Anwesenheit der Plasmide selektionierten, jedoch kein Uracil enthielten. Für die Gegenselektion wurden sie auf FOA-haltige (WAK-Chemie, Bad Solen) Nährplatten (2.1.6) aufgetropft. Um die aufgetropften Zellzahlen überprüfen

zu können, wurden dieselben Verdünnungen auf selektive, Uracil-haltige Nährplatten gegeben. Die Platten wurden bei der für den jeweiligen Stamm optimalen Wachstumstemperatur für 3-5 Tage inkubiert.

2.2.3.2 Semiquantitative Analyse der Konkurrenzexperimente

Um die Wachstumseffizienz der Zellen, die Sec63-C_{UB}-RUra3p von dem nativen *SEC63*-Promotor, N_{UG}-Sec62p vom *P_{CUP1}*-Promotor und ein kompetitierendes Protein vom *P_{GALI}*-Promotor aus exprimierten zu testen, wurden ca. 10⁴ Zellen der Transformanten auf Galaktosehaltige Ura⁻-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, für 7 Tage bei 30°C inkubiert und die nach dieser Zeit gewachsenen Kolonien unabhängig von ihrer Größe gezählt. Von jeder Transformante wurden zwei Platten ausgestrichen und das arithmetische Mittel der Kolonienzahlen gebildet. Für jede Analyse wurden mindestens drei unabhängige Auszählungen vorgenommen und das arithmetische Mittel der Kolonienzahlen verwendet. Um den unterschiedlichen Expressionsniveaus der kompetitierenden Proteine gerecht zu werden, wurde in der sec62-1p-Konkurrenzanalyse durch Verwendung des *P_{MET25}*-Promotors die Expression des Sec62-Dha demjenigen des sec62-1-Dha angeglichen (siehe Abschnitt 3.3.5). In der Analyse mit den Sec62p-Deletionsmutanten (siehe Abschnitt 3.3.2) wurden die Proteinmengen der Dha-modifizierten Proteine mit Hilfe des Lumi-Imagers (Roche Diagnostics, Mannheim) ermittelt. Zur Quantifizierung wurden beide Fraktionen der Doppelbanden verwendet, die stets für das wt-Sec62-Dha und die C-terminalen Deletionsmutanten auftraten. Sec62-Dha wurde am stärksten exprimiert (Proteinmenge = 100%), die Proteinmengen der Deletionsmutanten wurden relativ dazu bestimmt. Die arithmetischen Mittel der gezählten Kolonienzahlen wurden durch die am Lumi-Imager ermittelten, relativen Expressionsniveaus der Dha-modifizierten Proteine geteilt. Der so für Sec62-Dha ermittelte Wert wurde willkürlich auf 100% gesetzt und die Werte der Deletionsmutanten wurden hierzu prozentual in Beziehung gesetzt. Die in Prozent angegebenen, relativen Werte wurden als „Konkurrenzeffizienz“ bezeichnet. Für die Konkurrenzanalyse der Sec62p-Homologen aus anderen Spezies (siehe Abschnitt 3.4.1) wurden die Kolonienzahlen aus den folgenden Gründen nicht an die zellulären Proteinmengen angeglichen. Das Sec62p-Homologe aus *Y. lipolytica* erreichte nur ca. 1% der Proteinmenge des Sec62p aus *S. cerevisiae* und wurde deshalb bei der Bewertung der Ergebnisse gesondert behandelt (siehe 4.3.4). Die Sec62p homologen Proteine aus *S. pombe* und *H. sapiens* wurden mindestens ebenso gut exprimiert wie das *S. cerevisiae*-Sec62p, weshalb eine Angleichung der Proteinmengen nicht notwendig erschien.

Wurden bei den verschiedenen Konkurrenzexperimenten dieselben kompetitierenden Proteine eingesetzt (z. B. Sec62-Dha in allen drei Analysen), so konnte die gezählte Kolonienzahl zwi-

schen den verschiedenen Experimenten leicht variieren. Dies ist auf die Verwendung jeweils anderer Nährplatten, einer anderen Transformantenreihe, Temperaturschwankungen, u. Ä. zurückzuführen. Innerhalb ein und desselben Konkurrenzexperimentes ließen sich die gemessenen relativen Konkurrenzeffizienzen jedoch immer sehr gut reproduzieren.

2.2.3.3 Paarung (Kreuzung) transformierter, haploider Hefen

Je eine Einzelkolonie der beiden Paarungspartner (*Mata*, *Mat α*) wurde auf eine gemeinsame YPD-Platte (2.1.6) so ausgestrichen, dass die Zellen der verschiedenen Paarungstypen vorsichtig miteinander vermischt werden konnten. Nach Inkubation der Zellen \bar{u}/N bei der für die Stämme optimalen Wachstumstemperatur wurden sie auf eine für diploide Zellen selektive SD-Platte (2.1.6) replikaplattiert.

2.2.3.4 Semiquantitativer Paarungstest

Die Hefestämme, deren Paarungseffizienz getestet werden sollten, wurden in YPD-Medium (2.1.6) angezogen, in demselben Medium verdünnt, und 10^6 Zellen wurden in Quadranten auf YPD-Platten ausgestrichen. Nach einer eintägigen Inkubationszeit wurden die Koloniequadrate auf einen Rasen von 10^7 Zellen eines Paarungsteststammes des komplementären Paarungstypes umgestempelt. Die Selektionsplatte, auf die replikaplattiert wurde, erlaubte nur das Wachstum von gepaarten (diploiden) Zellen.

2.2.3.5 Sporulation von Hefen und Tetradensektion

Eine \bar{u}/N -Kultur von 10 ml des diploiden Hefestammes wurde so lange bei RT inkubiert, bis sich die Zellen am Boden des Reagenzglases abgesetzt hatten. Der flüssige Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in der Restflüssigkeit resuspendiert und die konzentrierte Zellsuspension wurde auf eine Sporulationsplatte (2.1.6) ausgestrichen. Nach 5-7 Tagen bei der für den jeweiligen Stamm optimalen Wachstumstemperatur konnten die Sporen unter dem Lichtmikroskop analysiert werden.

Für die Trennung der Sporentetraden wurden sporulierende Hefezellen mit einem sterilen Zahnstocher in 200 μ l steriles dest. Wasser gegeben und mit 2 μ l Glukoronidase versetzt. Nach 10-15 min Inkubationszeit wurden 20 μ l dieser Zellsuspension in einer Linie auf eine YPD-Platte (2.1.6) ausgestrichen. Unter einem Lichtmikroskop wurden erkennbare Sporentetraden mit der Glasspitze eines Tetraden-Mikromanipulators vereinzelt. Die vier Sporen wurden isoliert an definierten Positionen der YPD-Platte abgelegt. Zum Auskeimen der Sporen wurde die Platte bei der für den jeweiligen Stamm optimalen Wachstumstemperatur so lange inkubiert, bis deutlich erkennbare Kolonien herangewachsen waren. Dann konnte der Phänotyp der je vier zusammen-

gehörigen Meioseprodukte durch Replikaplattierung auf selektive Platten (2.1.6) bestimmt werden.

2.2.4 Bildbearbeitung

Agarplatten mit Hefezellen wurden mit dem Studioscan IIsi (AGFA, Leverkusen) eingelesen. Die Detektion der Lichtemission und die Quantifizierung der Proteinmengen bei Westernblotanalysen erfolgte durch einen Lumi-Imager (Roche Diagnostics, Mannheim). Die weitere Bearbeitung der Abbildungen erfolgte mit dem Programm Adobe PhotoshopTM 5.5.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der räumlichen Nähe zwischen den ER-Translokonproteinen Sec62p und Sec63p *in vivo*

Sec62p und Sec63p sind essentielle Komponenten des heptameren Sec-Komplexes, der Proteine posttranslational über die ER-Membran transportiert. Deshaies *et al.* zeigten 1991 durch die Koimmunpräzipitation von Sec62p und Sec63p, dass sich beide zusammen mit Sec71p und Sec72p in einem stabilen tetrameren Proteinkomplex befinden. Da der heptamere Sec-Komplex selbst unter relativ schonenden Bedingungen in den trimeren Sec61p- und den tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex zerfällt, scheint Sec61p hingegen eher schwach mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex assoziiert zu sein. Sec63p eignete sich also als Markerprotein, um eine neue Methode zur Untersuchung der *in vivo*-Interaktion von Membranproteinen zu etablieren. Es wurde mit dem Split-Ub-System versucht, die Interaktion von Sec63p mit anderen Translokonkomponenten zu detektieren.

Der cytosolische Carboxyterminus von Sec63p wurde mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins, C_{UB}, verlängert. Als Reporterproteine wurden zwei verschiedene Enzyme, die jeweils an den C-Terminus des C_{UB} fusioniert wurden, eingesetzt. Das erste Reporterprotein Dha besteht aus dem Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus der Maus, die C-terminal um das kleine Peptidepitop ha aus dem Influenzavirus verlängert wurde (Dha), um seine immunologische Detektion zu ermöglichen (Johnsson und Varshavsky, 1994a). Das resultierende Fusionsprotein Sec63-C_{UB}-Dha hat ein Molekulargewicht von etwa 104 kDa. Wird das Fusionsprotein in Hefezellen exprimiert, kann es nach Herstellung von Gesamtproteinextrakten und SDS-PAGE durch einen Immunblot mit anti-ha-Antikörper nachgewiesen werden. Kommt es während der Koexpression von Sec63-C_{UB}-Dha und einem N_{UB}-Fusionsprotein zur Reassoziierung der beiden Ub-Peptide, so wird die Abspaltung des Dha-Reporterproteins induziert. Dies kann auf dem Westernblot durch das veränderte Molekulargewicht des detektierten Proteins (Dha, 30 kDa) festgestellt werden (Abb 3.1). Das Verhältnis von gespaltenem zu ungespaltenem Fusionsprotein ist ein Maß für die Stärke der Interaktion zwischen Sec63-C_{UB}-Dha und dem entsprechenden N_{UB}-Fusionsprotein.

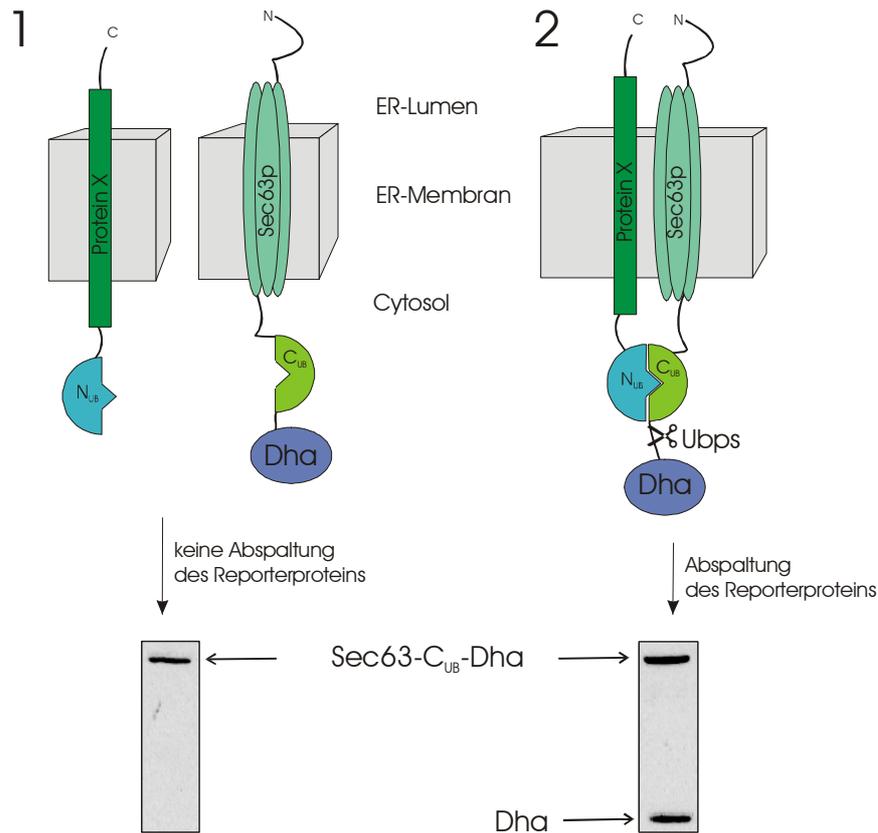


Abb 3.1: Verwendung von Dha als Reporterprotein im Split-Ub-Test.

C_{UB}-Dha ist an den C-Terminus von Sec63p fusioniert. N_{UB} verlängert den N-Terminus des Membranproteins X.

(1) Sec63-C_{UB}-Dha und Protein X interagieren nicht miteinander. Es kommt zu keiner N_{UB}-C_{UB}-Reassoziierung und das Reporterprotein Dha bleibt an Sec63-C_{UB} gekoppelt. Nach Herstellung eines Gesamtproteinextraktes und SDS-PAGE kann nur das ungeschnittene Sec63-C_{UB}-Dha durch einen Immunblot mit anti-ha-Antikörpern nachgewiesen werden.

(2) Sec63-C_{UB}-Dha und Protein X sind interagierende Proteine oder sich räumlich sehr nahe. N_{UB} und C_{UB} reassoziieren zum intakten Ubiquitin, die Ubps spalten das Reporterprotein Dha ab. Nach Herstellung eines Gesamtproteinextraktes und SDS-PAGE kann das abgespaltene Dha (und eventuell auch noch ungespaltenes Sec63-C_{UB}-Dha) durch einen Immunblot mit anti-ha-Antikörpern nachgewiesen werden. Das Verhältnis von gespaltenem zu ungespaltenem Fusionsprotein ist ein Maß für die lokale Konzentration der an die Proteine gekoppelten Ub-Hälften und somit ein Maß für die Stärke der Interaktion von Sec63-C_{UB}-Dha und Protein X.

Als zweites Reporterprotein wurde die Orothidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (Ura3p), ein Enzym des Uracil-Stoffwechsels, eingesetzt (Sec63-C_{UB}-RUra3p). Hefezellen, denen dieses Enzym fehlt, können nicht auf Uracil-freiem Nährmedium leben. Da eine N-terminale Proteinfusion die Aktivität der Ura3p nicht beeinträchtigt, sind Sec63-C_{UB}-RUra3p-exprimierende Zellen auf Ura⁻-Medium wachstumsfähig. Die Peptidbrücke, die den C-Terminus des C_{UB} mit dem N-Terminus des Ura3p verbindet, wurde so gewählt, dass nach der Spaltungsreaktion durch die Ubps der neue N-Terminus des abgetrennten Ura3p mit der Aminosäure Arginin beginnt (RUra3p). Nach der sogenannten N-End-Regel bestimmt die Identität der N-terminalen Aminosäure eines Proteins dessen Halbwertszeit (Bachmair *et al.*, 1986). Arginin wirkt gemäß der N-End-Regel destabi-

lisierend, so dass ein Protein mit aminoterminalem Arginin innerhalb weniger Minuten abgebaut wird. Findet also während der Koexpression von Sec63-C_{UB}-RUra3p und einem N_{UB}-Fusionsprotein die Abspaltung des RUra3p statt, so wird das Reporterprotein schnell proteolytisch abgebaut. Die Hefezellen sind nicht in der Lage, auf Ura⁻-Medium zu wachsen. Die Effizienz der N_{UB}-C_{UB}-Reassoziierung kann somit leicht durch einen Wachstumstest auf Uracil-freien Nährplatten verfolgt werden (Abb 3.2). Das Ausmaß der Wachstumshemmung der Hefezellen ist ein Maß für die Stärke der Interaktion zwischen Sec63-C_{UB}-RUra3p und dem entsprechenden N_{UB}-Fusionsprotein. Die Verwendung des RUra3p als Reporterprotein ermöglicht außerdem die Gegenselektion auf FOA-haltigen Platten (Boeke und Fink, 1987). FOA (5-Fluor-Orothsäure) ist toxisch für Hefezellen, da es zur Hemmung der Thymidin-Synthase führt. Zellen, die RUra3p nicht schnell abbauen, sterben auf FOA-haltigem Medium, weshalb ein Wachstum von Zellen auf solchen Platten eine effiziente N_{UB}-C_{UB}-Interaktion anzeigt.

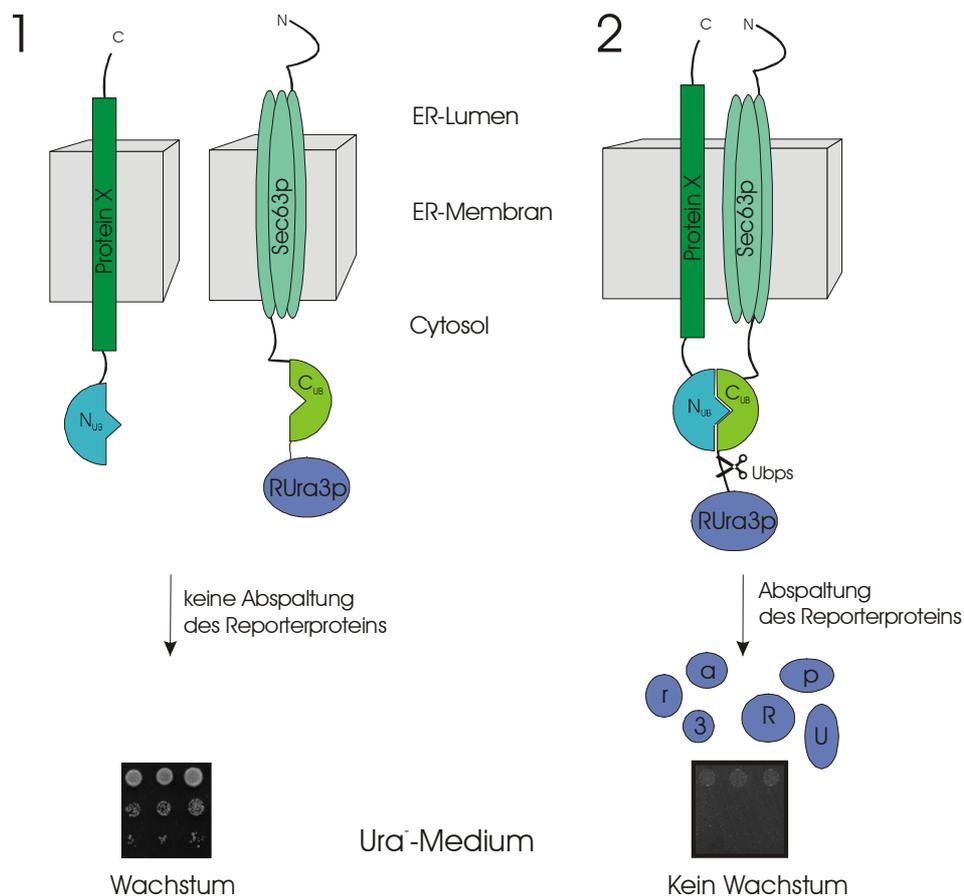


Abb 3.2: Verwendung von RUra3p als Reporterprotein im Split-Ub-Test.

C_{UB}-RUra3p ist an den C-Terminus von Sec63p fusioniert. N_{UB} verlängert den N-Terminus des Membranproteins X.

(1) Sec63-C_{UB}-RUra3p und Protein X interagieren nicht miteinander. Es kommt zu keiner N_{UB}-C_{UB}-Fusion, das Reporterprotein RUra3p bleibt an Sec63-C_{UB} gekoppelt und die Zellen können auf Uracil-freiem Nährmedium wachsen.

(2) Sec63-C_{UB}-RUra3p und Protein X sind interagierende Proteine oder sich räumlich sehr nahe. N_{UB} und C_{UB} reassoziieren zum intakten Ubiquitin, die Ubps spalten das Reporterprotein RUra3p ab, was gemäß der N-End-Regel schnell abgebaut wird. Die Hefezellen können nicht auf Uracil-freiem Nährmedium wachsen. Das Ausmaß der Wachstumshemmung der Hefezellen ist ein Maß für die Stärke der Interaktion zwischen Sec63-C_{UB}-RUra3p und Protein X.

Die Konstrukte SEC63-C_{UB}-DHA und SEC63-C_{UB}-RURA3 wurden homolog in den diploiden Hefestamm JD51 rekombiniert, so dass eine der beiden SEC63-Genkopien durch das jeweilige Fusionsgen ersetzt wurde (siehe 2.2.1.14.1). In den resultierenden Stämmen C63D-5 51 und C63R-5 51 wurde die Expression der Fusionsproteine durch den nativen SEC63-Promotor reguliert. Alle eingesetzten N_{UB}-Fusionsproteine standen, wenn nicht anders erwähnt, unter der Kontrolle des durch Cu²⁺-Ionen induzierbaren Kupfer-Metallothionein-Promotors (*P_{CUPI}*-Promotor) aus der Hefe. Der Promotor zeigt auch ohne Kupferinduktion eine Grundaktivität. Alle Analysen wurden, falls nicht anders erwähnt, ohne CuSO₄-Zugabe zum Nährmedium durchgeführt.

3.1.1 Funktionalität der Fusionsproteine Sec63-C_{UB}-Dha und Sec63-C_{UB}-RUra3p

Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der relativen Distanzen zwischen zwei Proteinen ist deren korrekte Lokalisation in der Zelle. Nur wenn die dargestellten Fusionsproteine ihren natürlichen Platz einnehmen, ist die Messung der zwischen ihnen liegenden Distanzen sinnvoll. Da die Funktionalität eines Fusionsproteins eng mit seiner korrekten Lokalisation gekoppelt ist, kann ein Funktionalitätstest Aufschluss darüber geben, ob das Protein richtig lokalisiert ist. Die Funktionalität der Sec63-Fusionsproteine wurde durch Sporulation der Stämme C63D-5 51 und C63R-5 51 und anschließender Tetradenanalyse bestimmt. Die Lebensfähigkeit aller vier haploiden Sporen belegte die Funktionalität der Sec63p-Fusionsproteine (nicht gezeigt). Da die haploiden Zellen, die die modifizierten Sec63p-Versionen exprimierten, jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Wachstumsverzögerung zeigten, wurden alle Interaktionsstudien in diploiden Zellen durchgeführt.

3.1.2 Sec62p und Sec63p interagieren *in vivo*

Um die Interaktion von Sec63p und Sec62p zu untersuchen, wurden Sec63-C_{UB}-Dha und N_{UB}-Sec62p in Hefezellen koexprimiert. Die Fusion von N_{UB} an den cytosolischen N-Terminus des Sec62p beeinträchtigt die Funktionalität des Proteins nicht (Dünnwald *et al.*, 1999). Nach Herstellung von Gesamtproteinextrakten und SDS-PAGE wurde eine Westernblot-Analyse mit anti-ha-Antikörpern durchgeführt. Abb 3.3 A zeigt, dass alle drei N_{UB}-Versionen von Sec62p zur Abspaltung des Dha-Reporterproteins von Sec63-C_{UB}-Dha führten. N_{UI}- und N_{UA}-Sec62p konnten die vollständige Prozessierung des C_{UB}-Fusionsproteins bewirken. Bei Koexpression von

N_{UG} -Sec62p wurden noch etwa 60% des Sec63- C_{UB} -Dha gespalten. Johnsson und Varshavsky detektierten eine ähnliche Spaltungsrate bei Koexpression zweier stark interagierender, N_{UG} - und C_{UB} -modifizierter Leucin-Zipper Proteine (Johnsson und Varshavsky, 1994a). Dies lässt auf eine ebenfalls enge Interaktion der beiden Translokonproteine schließen. In Zellen, die Sec63- C_{UB} -Dha allein exprimierten, kam es zu keiner Abspaltung des Reporterproteins. Zur Kontrolle wurden auch Extrakte von Zellen untersucht, die N_{UB} -Bos1p, ein ER-Membranprotein, das nicht mit Sec63p interagiert, koexprimierten. Hier induzierte nur N_{UI} -Bos1p die Abspaltung des Dha, die N_{UA} - und N_{UG} -Versionen konnten keine Spaltungsreaktion bewirken. Die Funktionalität von N_{UB} -Bos1p konnte durch seine Expression in haploiden Hefezellen nach homologer Rekombination von N_{UB} -*BOS1* an den *BOS1*-Genlocus bestätigt werden (siehe 2.2.1.14.1).

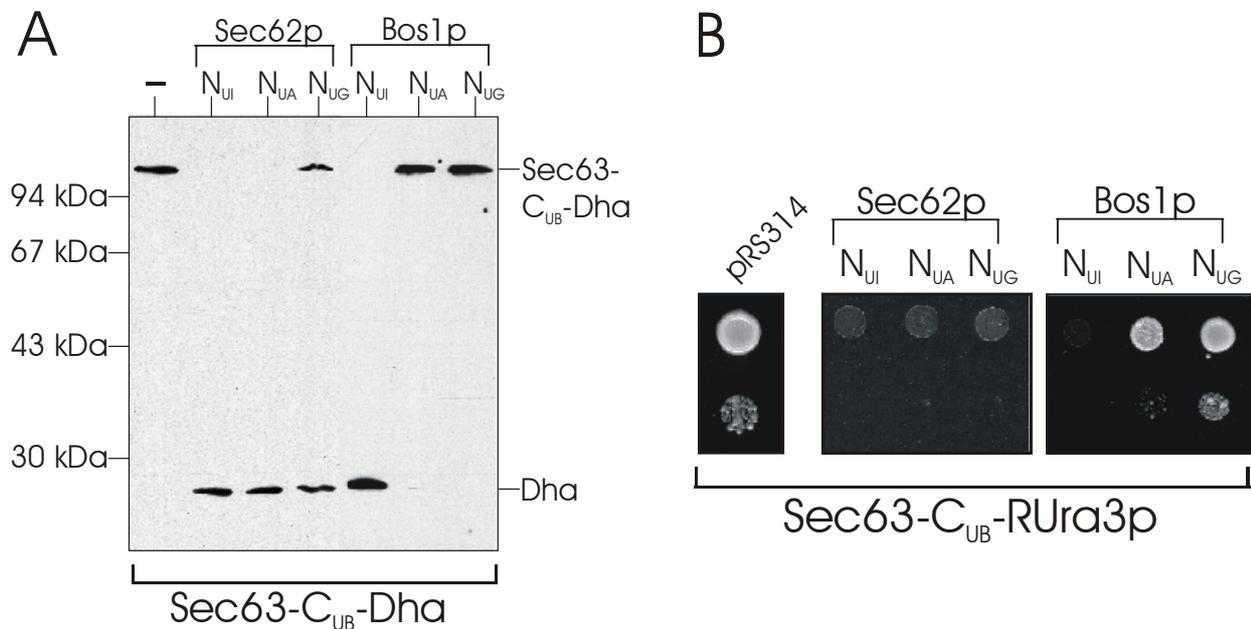


Abb 3.3: Nachweis der Interaktion von Sec63p und Sec62p durch die Split-Ub-Methode *in vivo*.

(A) Westernblot-Analyse unter Verwendung des Reporterproteins Dha. Sec63- C_{UB} -Dha wurde alleine oder gemeinsam mit N_{UB} -Sec62p oder N_{UB} -Bos1p im Stamm C63D-5 51 exprimiert. Es wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, die in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt wurden. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Antikörper.

(B) Wachstumstest (Interaktionstest) unter Verwendung des Reporterproteins RUra3p. Sec63- C_{UB} -RUra3p wurde gemeinsam mit pRS314, N_{UB} -Sec62p oder N_{UB} -Bos1p im Stamm C63R-5 51 exprimiert. Die Zellen wurden in Uracil-haltigem SD-Medium angezogen. In Verdünnungen von 10^5 und 10^3 Zellen wurden die Hefen auf Ura⁻-Platten aufgetropft und fünf Tage bei 30°C inkubiert.

Das mit Hilfe des Dha-Reporterproteins erzielte Ergebnis sollte nun mit dem zweiten Reporter-system im physiologischen Wachstumstest bestätigt werden. Sec63- C_{UB} -RUra3p wurde mit N_{UB} -Sec62p sowie mit N_{UB} -Bos1p in Hefezellen koexprimiert. Die Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen auf Uracil-freie und zur Wachstumskontrolle auf Uracil-haltige Nährplatten auf-

getropft. Es wurden ebenfalls Zellen aufgetropft, die neben *SEC63-C_{UB}-RURA3* nur ein leeres Plasmid trugen. Letztere konnten gut auf Ura⁻-Platten wachsen. N_{UI}-, N_{UA}- und N_{UG}-Sec62p induzierten die vollständige Abspaltung des R_{Ura3p}-Reporterproteins vom C_{UB}-Fusionsprotein, so dass das Zellwachstum gänzlich verhindert wurde (Abb 3.3 B). Im Gegensatz dazu waren nur die mit *N_{UI}-BOS1* transformierten Zellen nicht fähig, auf Ura⁻-Medium zu wachsen. Die mit *N_{UA}-BOS1* transformierten Zellen wuchsen bereits in der geringsten Verdünnung und N_{UG}-Bos1p erlaubte vollständiges Wachstum der Hefen. Der Interaktionstest konnte also die aus dem Westernblot geschlossene, enge Nachbarschaft der Proteine Sec63p und Sec62p bestätigen.

Um sicherzugehen, dass der in Anwesenheit von N_{UB}-Sec62p auf Ura⁻-Platten gemessene Wachstumsdefekt der C63R-5 51-Zellen auf den Abbau des R_{Ura3p} zurückzuführen ist, wurde dieses Experiment im Hefestamm JD55 wiederholt. In JD55 ist das Gen für das Schlüsselenzym der N-End-Regel, Ubr1p, deletiert. Kommt es in diesen Zellen zur Abspaltung des R_{Ura3p}, so findet dessen Proteolyse nicht statt und die Zellen sollten auf Uracil-freien Nährplatten wachsen. Sec63-C_{UB}-R_{Ura3p} wurde gemeinsam mit einem Leerplasmid bzw. mit N_{UB}-Sec62p in JD55-Zellen exprimiert und auf Ura⁻-Platten getropft. Alle Transformanten zeigten vollständiges Wachstum in *Δubr1*-Zellen (Abb 3.4). Dies zeigt, dass der Ura⁻-Phänotyp der entsprechenden Transformanten in *UBR1*-Hefen allein auf die N_{UB}-induzierte Abspaltung und den nachfolgenden schnellen Abbau des R_{Ura3p} durch die Enzyme der N-End-Regel zurückzuführen ist.

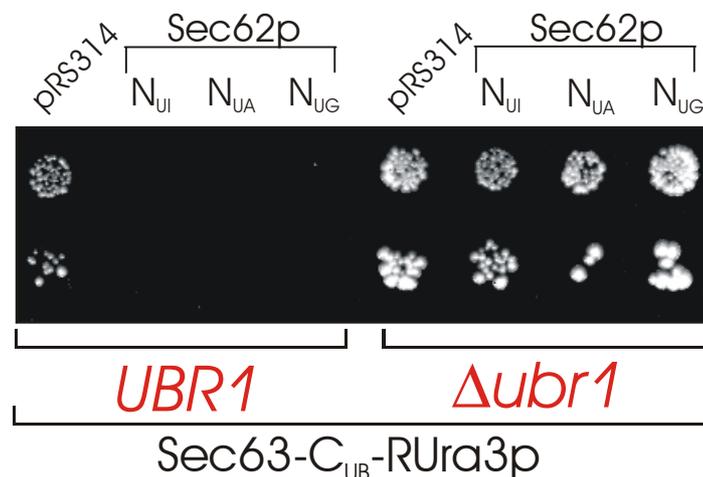


Abb 3.4: Der Abbau des abgespaltenen Reporterproteins R_{Ura3p} wird durch die Enzyme des N-End-Regel-Pfades bewirkt.

Zellen der Stämme C63R-5 51 (*UBR1*) und JD55 (*Δubr1*), die Sec63-C_{UB}-R_{Ura3p} und gleichzeitig N_{UB}-Sec62p exprimierten oder das leere Plasmid pRS314 enthielten wurden in Uracil-haltigem SD-Medium angezogen. 10⁴ und 10³ Zellen wurden auf Ura⁻-Platten getropft und die Platten fünf Tage bei 30°C inkubiert.

3.1.3 Die Interaktion von Sec63-C_{UB}-RUra3p und N_{UG}-Sec62p ist mit unmodifiziertem Sec62p kompetitierbar

Ich konnte bisher zeigen, dass Sec63p eine größere Nähe zu Sec62p aufweist als zu Bos1p, einem ER-Membranprotein, welches nicht an der Translokation beteiligt ist. Wenn Sec63p und Sec62p, wie Deshaies *et al.* 1991 publizierten, Mitglieder eines gemeinsamen Proteinkomplexes sind, so muss die Interaktion der modifizierten Proteine durch Überexpression einer ihrer unmodifizierten Komponenten kompetitierbar sein (Abb 3.5). Konkret würde man erwarten, dass in Zellen, die neben C_{UB}-modifiziertem Sec63p und N_{UG}-Sec62p noch zusätzlich - im Überschuss - natives, unmodifiziertes Sec62p exprimieren, die Spaltungsrate des Reporterproteins reduziert werden sollte.

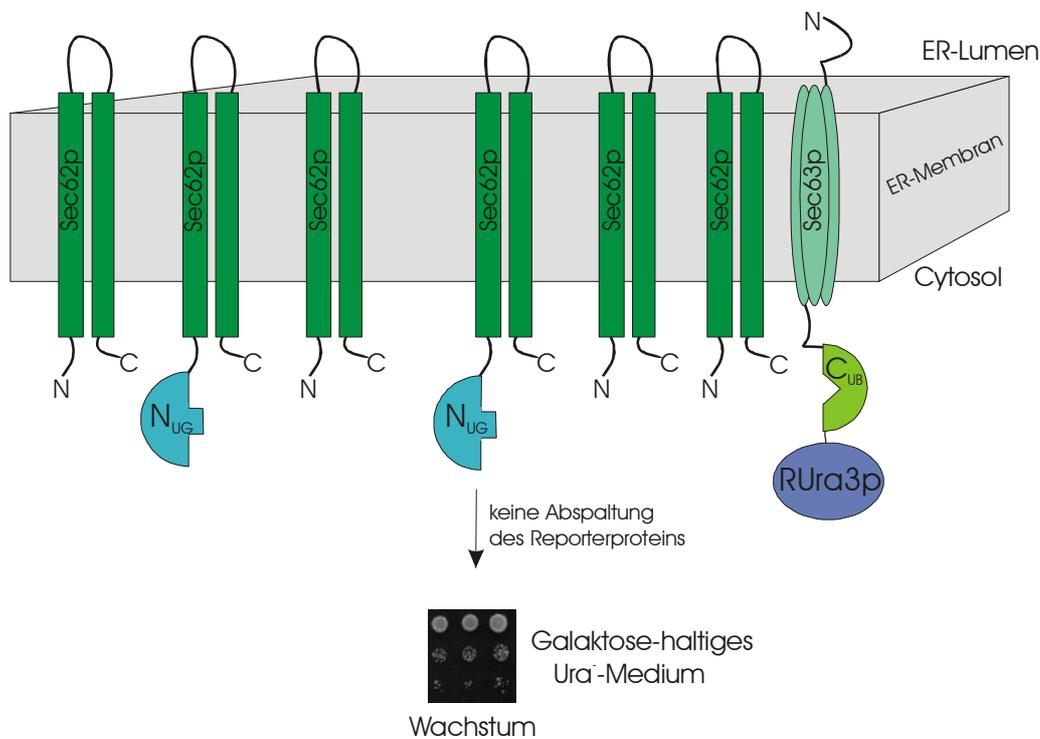


Abb 3.5: Modell der Konkurrenz von N_{UG}-Sec62p und unmodifiziertem Sec62p um Sec63-C_{UB}-RUra3p.

Sec63-C_{UB}-RUra3p wird gemeinsam mit dem unter der Kontrolle des Kupferpromotors exprimierten N_{UG}-Sec62p und mit unmodifiziertem Sec62p, dessen Expression durch den P_{GALI}-Promotor kontrolliert wird, synthetisiert. Wenn die Zellen auf Galaktose-haltigem Medium wachsen, ist das unmodifizierte Sec62p in großem zellulären Überschuss vorhanden. Es verdrängt das N_{UG}-Sec62p aus dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex, so dass die Reassoziierung von N_{UG} und C_{UB} weniger häufig stattfindet und die Zellen wieder auf Ura⁻-Platten wachsen können.

Diese Vorhersage wurde in C63R-5 51-Zellen, die mit dem Konstrukt P_{CUPI} N_{UG}-SEC62 und dem Konkurrenzkonstrukt P_{GALI} SEC62 transformiert wurden, getestet. Der Galaktose-Promotor ist ein durch das Kohlehydrat Galaktose induzierbarer, starker Promotor. In Hefezellen, die auf Glukose-haltigem Medium wachsen, ist er vollständig abgeschaltet. Das kompetitive-

rende Protein, unmodifiziertes Sec62p, wurde also nur auf Galaktose-haltigen Nährplatten exprimiert, und sollte nur dann N_{UG}-Sec62p verdrängen können. Neben dem Leerplasmid wurden als zusätzliche Kontrollen statt Sec62p zwei Proteine unter dem P_{GAL1}-Promotor exprimiert, die keine Rolle in der Translokation spielen. Ste14p ist eine Carboxylmethyltransferase, die in der ER-Membran lokalisiert ist (Romano *et al.*, 1998; Lewke, N., Dissertation 1999). Sie wurde an ihrem C-Terminus mit Dha verlängert (Ste14-Dha). Tpi1p bezeichnet die cytosolische Triosephosphatisomerase des Glukosestoffwechsels (Alber und Kawasaki, 1982). Hier wurde carboxyterminal ein ha-Epitop angehängt (Tpi1-ha). Außerdem wurde neben der unmodifizierten Sec62p-Version zusätzlich ein Sec62-Dha zur Konkurrenz eingesetzt. Die Verwendung von Dha bzw. ha ermöglichte die immunologische Detektion der verschiedenen Proteine und somit die Abschätzung ihrer relativen zellulären Konzentration. Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abb 3.6 A dargestellt. Auf Glukose-haltigen Ura⁻-Platten wurde die Expression der konkurrierenden Proteine reprimiert und es konnte erwartungsgemäß keiner der Transformanten wachsen. Auf Galaktose-haltigen Ura⁻-Platten hingegen demonstrierte das Wachstum der Transformanten, die Sec62p und Sec62-Dha als konkurrierende Proteine überexprimierten, die effiziente Verdrängung des N_{UG}-Sec62p. Die Hefen, die die Kontrollproteine exprimierten bzw. das leere Plasmid enthielten, zeigten auf Galaktose-haltigen Ura⁻-Platten kein Wachstum. Im Immunblot konnte die starke Expression der mit Dha bzw. ha verlängerten Proteine bei Galaktoseinduktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Durch den Einsatz eines Sec62p-Antikörpers bewies ich die Anwesenheit des unmodifizierten Sec62p unter Galaktoseinduktion (nicht gezeigt). Mit Hilfe des Sec62p-Antikörpers konnte ich ebenfalls demonstrieren, dass das Expressionsniveau des N_{UG}-Sec62p sowie des ebenfalls noch in den Zellen vorhandenen nativen Sec62p unabhängig von der Art der Kohlehydratquelle war, in der die Zellen herangezogen wurden (nicht gezeigt). Um das Ausmaß der erhaltenen Konkurrenz zu quantifizieren, wurden etwa 10⁴ Zellen der verwendeten Transformanten auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausplattiert und die Anzahl der nach sieben Tagen herangewachsenen Kolonien gezählt (Abb 3.6 B). Ungefähr 800 Kolonien wuchsen bei Überexpression von Sec62p, etwa die Hälfte bei der Überexpression von Sec62-Dha. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Extension von Dha am C-Terminus des Sec62-Proteins dessen Interaktion mit Sec63p behindern könnte. Wurden allerdings Ste14-Dha bzw. Tpi1-ha überexprimiert, zählte ich nur ca. 60 bzw. 40 Kolonien. Bei den Transformanten, die nur das Leerplasmid enthielten, konnten sich nur etwa 30 Hefekolonien bilden. Ich konnte also mit Hilfe der Split-Ub-Methode *in vivo* beweisen, dass Sec63p und Sec62p Mitglieder eines gemeinsamen Proteinkomplexes sind.

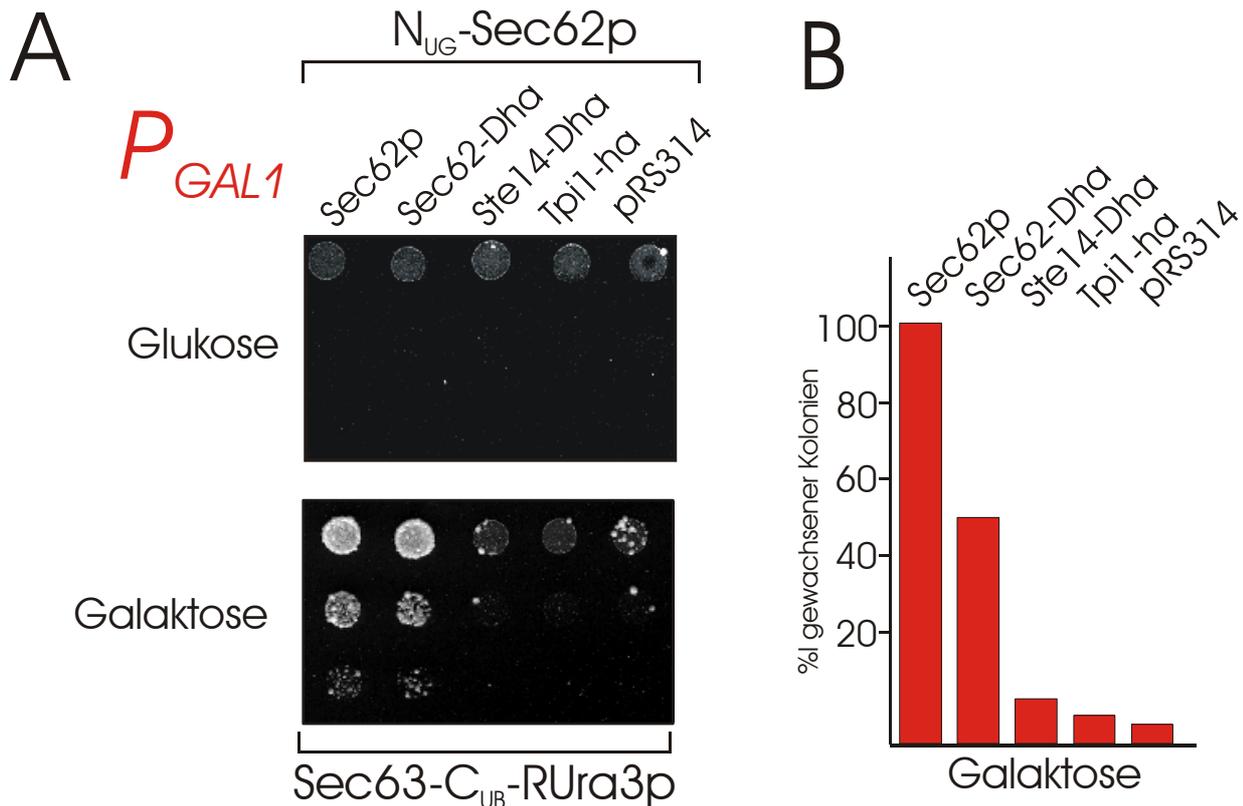


Abb 3.6: Die Interaktion von Sec63-C_{UB}-RUra3p und N_{UG} -Sec62p ist mit unmodifiziertem Sec62p und Sec62-Dha kompetitierbar.

(A) Interaktionstest in Zellen, die Sec63-C_{UB}-RUra3p und N_{UG} -Sec62p koexprimierten und die zusätzlich die angegebenen Proteine unter der Kontrolle des P_{GAL1} -Promotors exprimierten. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen. Sie wurden auf Glukose-haltige Ura⁻-Platten aufgetropft, um die Repression der Proteine unter der Kontrolle des P_{GAL1} -Promotors zu bewirken und auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten, um deren Induktion herbeizuführen. Es wurden jeweils 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen aufgetropft und die Platten fünf Tage bei 30°C inkubiert.

(B) Semiquantitative Analyse der Competition. Es wurden 10^4 Zellen der in (A) angegebenen Transformanten auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausplattiert. Die Anzahl der nach sieben Tagen bei 30°C gewachsenen Kolonien wurde gezählt. Der Wert für die das unmodifizierte Sec62p als kompetitierendes Protein enthaltende Zellen wurde willkürlich auf 100% gesetzt. Für die Grafik wurde der Durchschnitt aus sieben unabhängigen Experimenten verwendet.

3.2 Die mit der Split-Ub-Methode gemessenen Distanzen von Sec63p zu Proteinen bekannter Lokalisation ermöglichen eine grobe Kartierung der Zelle

Durch den Split-Ub-Test konnte die Interaktion der ER-Translokationsproteine Sec63p und Sec62p *in vivo* gezeigt werden. Im Folgenden sollte die Wechselwirkung von Sec63p mit anderen Komponenten des ER-Translokationsapparates sowie mit verschiedenen Membranproteinen bekannter Lokalisation, die sich in unterschiedlichen Zellkompartimenten aufhalten, untersucht werden. Ziel war hier, das molekulare Umfeld eines Membranproteins genauer zu charakterisieren. Da die Effizienz der N_{UB} -C_{UB}-Reassoziierung hauptsächlich durch deren lokale Konzentration in der

Zelle bestimmt wird, verläuft sie umso effizienter, je näher sich die beiden Proteine, die die jeweiligen Ub-Hälften tragen, sind. Ich würde also mit zunehmender Distanz der Fusionsproteine zu Sec63-C_{UB}-RUra3p eine Abnahme der Spaltungsreaktion erwarten. Dies würde sich in einer zunehmenden Uracil-Autotrophie der Transformanten widerspiegeln.

Es wurden N_{UB}-Fusionen (jeweils N_{UI}- N_{UA}- und N_{UG}-Fusionen) von 14 verschiedenen Proteinen, deren Lokalisation und Funktion in der Zelle gut dokumentiert sind, eingesetzt. Sec61p bildet als Translokationspore die Hauptkomponente des heptameren Sec-Komplexes. Ssh1p ist sequenz- und strukturhomolog zu Sec61p und bildet gemeinsam mit Sbh2p und Sss1p einen alternativen trimeren Komplex in der ER-Membran (Finke *et al.*, 1996), dessen Funktion allerdings noch ungeklärt ist. Als einzige Carboxymethyltransferase in *S. cerevisiae* modifiziert Ste14p wahrscheinlich posttranslational CaaX-Box enthaltende Proteine. Ste14p ist ein ER-Transmembranprotein (Romano *et al.*, 1998; Lewke, N., Dissertation 1999). Bos1p ist als v-SNARE an der vom ER zum Golgi-Apparat gerichteten Vesikelknospung beteiligt (Newman *et al.*, 1992). Das t-SNARE Sed5p kennzeichnet als Markerprotein das frühe Golgi-Kompartiment (Banfield *et al.*, 1994). Snc1p ist als Synaptobrevin auf Vesikeln lokalisiert, die vom späten Golgi-Apparat abknospen und zur Plasmamembran befördert werden (Conchon *et al.*, 1999). Das Syntaxin Sso1p in der Plasmamembran katalysiert die Fusion der vom Golgi ankommenden Vesikel mit der Plasmamembran (Aalto *et al.*, 1993). Das t-SNARE Pep12p ist in der Membran von Endosomen lokalisiert (Becherer *et al.*, 1996). Vam3p hält sich als t-SNARE in der Vakuolenmembran auf (Darsow *et al.*, 1997). Tom22p sitzt in der äußeren Mitochondrienmembran (Kiebler *et al.*, 1993). Schließlich wurden noch zwei cytosolische Proteine, die schon beschriebene Triosephosphatisomerase Tpi1p und Guk1p, die Guanylatkinase, (Konrad, 1992) verwendet. Die Funktionalität aller N_{UB}-Fusionsproteine bis auf N_{UB}-Ssh1p, N_{UB}-Snc1p, N_{UB}-Tom22p und N_{UB}-Vam3p wurde durch Funktionalitätstests bestätigt.

Alle N_{UB}-Fusionsproteine wurden gemeinsam mit Sec63-C_{UB}-RUra3p in diploiden Zellen exprimiert und auf Uracil-freie SD-Platten aufgetropft. Abhängig von der Identität der jeweiligen N_{UB}-Proteine wurde ein gut reproduzierbares, charakteristisches Wachstumsverhalten der Hefetransformanten beobachtet (Abb 3.7).

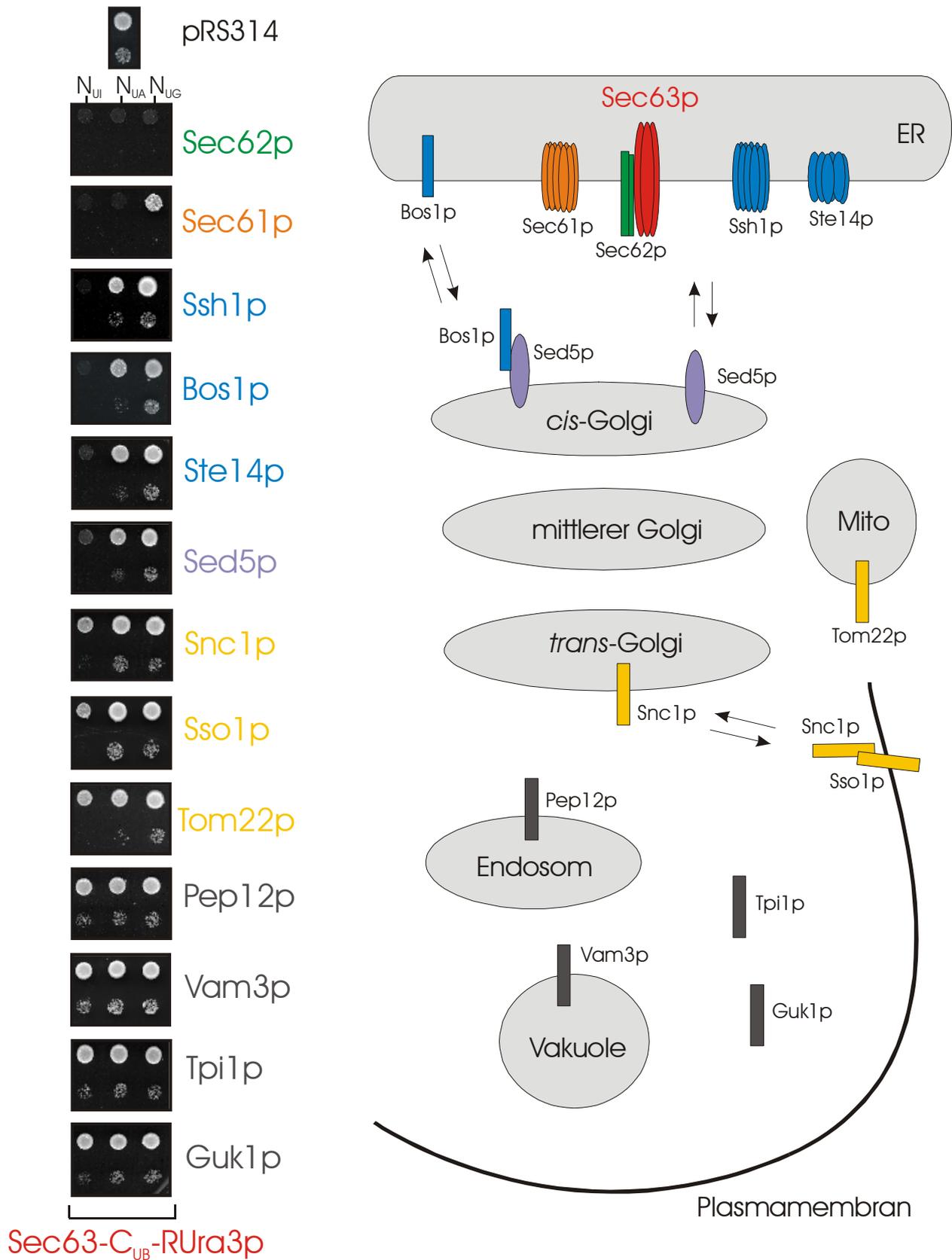


Abb 3.7: Untersuchung des molekularen Umfeldes von Sec63p.

Interaktionstest in diploiden Zellen, die Sec63-C_{UB}-Rura3p und pRS314 enthielten, bzw. die angegebenen N_{UB}-Proteine unter der Kontrolle des *P_{CUP1}*-Promotors exprimierten. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen und 10⁵ und 10³ Zellen wurden auf SD-Platten ohne Uracil aufgetropft. Die Platten wurden fünf Tage bei 30°C inkubiert.

Die Stärke der Interaktion der N_{UB} -Fusionen mit Sec63- C_{UB} -RUra3p nahm von den Proteinen des Sec-Komplexes über Proteine desselben Kompartimentes (ER-Membranproteine) zu Proteinen anderer Kompartimente kontinuierlich ab. Die Ergebnisse des Interaktionstests sind in Tab 3.1 zusammengefasst.

| N_{UB} -Fusionsprotein | Lokalisation | Wachstumsvermögen | | | |
|--------------------------|------------------------|-------------------|----------|----------|-------|
| | | N_{UI} | N_{UA} | N_{UG} | FOA |
| Sec62p | ER | - | - | - | R |
| Sec61p | ER | - | - | + | R |
| Ssh1p | ER | - | ++ | +++ | S |
| Bos1p | ER | - | ++ | +++ | S |
| Ste14p | ER | - | ++ | +++ | S |
| Sed5p | <i>cis</i> -Golgi | - | ++ | +++ | S |
| Snc1p | <i>trans</i> -Golgi/PM | + | +++ | +++ | S |
| Sso1p | PM | + | +++ | +++ | S |
| Tom22p | Mitochondrium | + | +++ | +++ | n. d. |
| Pep12p | Endosom | +++ | +++ | +++ | S |
| Vam3p | Vakuole | +++ | +++ | +++ | S |
| Tpi1p | Cytosol | +++ | +++ | +++ | S |
| Guk1p | Cytosol | +++ | +++ | +++ | S |

Tab 3.1: Ergebnisse des Wachstumstests von Zellen, die Sec63- C_{UB} -RUra3p und die aufgeführten N_{UB} -Fusionsproteine unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors exprimierten.

Das Wachstum wurde auf Uracil-freien SD-Platten verfolgt. Das Wachstumsvermögen der Zellen wurde wie folgt angegeben. -: kein Wachstum; +: schwaches Wachstum; ++: eingeschränktes Wachstum; +++: vollständiges Wachstum. In der mit „FOA“ betitelten Spalte wurde das Wachstum der Zellen auf FOA-haltigen Platten beurteilt. R: FOA-resistent; S: FOA-sensitiv; n. d.: nicht durchgeführt. PM: Plasmamembran.

3.2.1 Sec63p zeigt die größte Nähe zu Proteinen des Translokationskomplexes

Die stärkste Interaktion von Sec63- C_{UB} -RUra3p und N_{UB} -Fusionsproteinen konnte mit ER-Translokationproteinen erzielt werden. Nur die Zellen, die N_{UB} -Fusionen von Translokationskomponenten enthielten, ließen sowohl für N_{UI} - als auch für N_{UA} -Versionen kein Wachstum der Hefen zu. Von diesen Proteinen verhinderte allein N_{UG} -Sec62p das Zellwachstum der C63R-5 51-Transformanten auf Ura⁻-Platten. Die mit N_{UB} -Sec61p transformierten Zellen zeigten nur für

N_{UG} -Sec61p noch ein Restwachstum. Die N_{UG} -Versionen aller anderen eingesetzten Proteine erlaubten uneingeschränktes Wachstum der Transformanten.

Alle ER-Membranproteine, die nicht an der Translokation beteiligt sind, lösten ebenfalls ein spezifisches Wachstumsverhalten der Hefezellen aus. Hier wurde das Wachstum der die N_{UI} -Fusionsproteine enthaltenden Zellen verhindert, wohingegen die N_{UA} -Versionen der Proteine ein nur leicht eingeschränktes Wachstum vermitteln. In diese Gruppe fallen Ssh1p, Bos1p und Ste14p. Aber auch N_{UB} -Sed5p löste als Protein des *cis*-Golgi-Apparates dieses Wachstumsverhalten der Zellen aus. Der Golgi-Apparat ist das dem ER räumlich und funktionell nächstgelegene Kompartiment. Der *cis*-Golgi ist der dem ER zugewandte Teil des Golgi-Kompartimentes.

3.2.2 Der Einsatz der neuen N_{UB} -Version N_{VI} ermöglicht die Abgrenzung des Sed5p von den ER-Membranproteinen

Um besser zwischen Sed5p und den ER-Membranproteinen unterscheiden zu können, wurde eine neue Mutante des N_{UB} eingesetzt, die an Position drei statt eines Isoleucins ein Valin trägt (N_{VI}). Die übrigen Aminosäuren der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins blieben unverändert. Die Reassoziations-effizienz des N_{VI} liegt zwischen der des N_{UI} , des wt- N_{UB} , und der des N_{UA} (Raquet, Eckert und Johnsson; Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht). Ich hoffte mit dieser neuen N_{UB} -Version die Auflösung im Split-Ub-Test vergrößern zu können. Wie in Abb 3.8 gezeigt, konnte ich mit Hilfe der N_{VI} -Versionen von Sec62p, Ssh1p, Bos1p, Sed5p, Sft1p (ein v-SNARE des mittleren Golgi-Kompartimentes), Snc1p und Sso1p tatsächlich eine klarere Unterscheidung zwischen ER- und Golgi-Proteinen treffen. Die N_{VI} -Fusionen aller ER-Membranproteine führten entweder zu keinem (Sec62p, Ssh1p) oder stark eingeschränktem Wachstum (Bos1p) der Zellen auf Uracil-freien Platten. Die N_{VI} -Fusionen des *trans*-Golgimembran-Plasmamembranproteins Snc1p und des Plasmamembranproteins Sso1p hingegen ließen uneingeschränktes Zellwachstum zu. N_{VI} -Sft1p inhibierte das Wachstum der C63R-51-Zellen, wenn auch nur in geringem Maße. Auch die N_{VI} -Sed5p-tragenden Zellen wuchsen weniger gut als die mit N_{VI} -*SNCI* und N_{VI} -*SSOI* transformierten Zellen, aber eindeutig besser als die Zellen, die N_{VI} -Fusionen von ER-Membranproteinen exprimierten. Ich kann daher Sed5p eindeutig von den ER-Membranproteinen unterscheiden und im Vergleich mit anderen N_{VI} -Fusionsproteinen dem *cis*-Golgi-Kompartiment zuordnen.

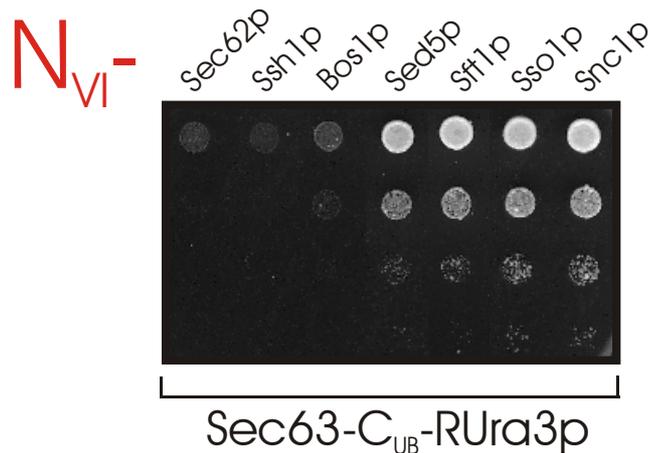


Abb 3.8: Einsatz der neuen N_{UB} -Mutante N_{VI} zur Abgrenzung des *cis*-Golgi-Proteins Sed5p von den ER-Transmembranproteinen.

Interaktionstest in diploiden Zellen, die Sec63- C_{UB} -RUra3p und die angegebenen N_{VI} -Fusionsproteine unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors exprimierten. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen und jeweils 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Zellen auf eine SD-Platte ohne Uracil aufgetropft. Die Platte wurde fünf Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.3 Das Sec61p-Homologe Ssh1p hat eine größere Distanz zu Sec63p als Sec61p

Ssh1p zeigt starke Homologie zu Sec61p und ist in einem zweiten heterotrimeren Proteinkomplex in der ER-Membran organisiert. Allerdings konnte Ssh1p nicht gemeinsam mit den Mitgliedern des Sec62p/Sec63p-Komplexes aufgereinigt oder mit Antikörpern gegen Mitglieder des Sec62p/Sec63p-Komplexes koimmunpräzipitiert werden (Finke *et al.*, 1996). Diese *in vitro*-Daten korrespondieren mit dem Wachstumsmuster der N_{UB} -Ssh1p bzw. N_{UB} -Sec61p exprimierenden Zellen in meinem Experiment (siehe Abb 3.7). Wo N_{UA} -Sec61p das Wachstum der Zellen vollständig verhindert, ist die Reassoziierung von N_{UA} -Ssh1p mit Sec63- C_{UB} -RUra3p so ineffizient, dass das beinahe vollständige Wachstum der Transformanten erreicht wird. N_{UB} -Ssh1p unterscheidet sich in seiner Wirkung auf das Wachstum der C63R-5 51-Zellen nicht von den N_{UB} -Fusionsproteinen aller anderen eingesetzten ER-Membranproteine, die nicht an der Translokation beteiligt sind. Somit ist Sec63p *in vivo* näher an Sec61p als an Ssh1p.

3.2.4 Die mit Sec63- C_{UB} -RUra3p gemessenen Distanzen zu Translokationskomponenten sind spezifisch

Die gemessene Nähe von Sec63p zu anderen Proteinen des ER-Translokationsapparates könnte eventuell auf einen physikalischen Kontakt des Sec63p mit diesen Translokationskomponenten während seiner Insertion in die ER-Membran zurückzuführen sein. Obwohl alle N_{UB} -Fusionsproteine vom P_{CUP1} -Promotor aus exprimiert wurden, ist es ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass einige der eingesetzten N_{UB} -Fusionsproteine eine höhere Konzentration in der Zelle erreichen. Um be-

urteilen zu können, ob die Nähe von Sec63p zu den anderen eingesetzten Translokationproteinen den Verhältnissen in der Zelle *in vivo* entspricht, musste ein weiteres ER-Markerprotein eingesetzt werden, welches nicht an der Translokation beteiligt ist. Ste14p ist wie Sec63p ein polytopisches Membranprotein des ER und wird wahrscheinlich ebenso durch die Translokation in die ER-Membran integriert. Ste14p wurde mit dem C_{UB}-RUra3p-Modul verlängert und seine Funktionalität bestätigt (Lewke, N., Dissertation 1999). Ste14-C_{UB}-RUra3p wurde mit den N_{UB}-Fusionen der ER-Membranproteine Sec62p, Sec61p, Ssh1p, Ste14p und Bos1p gemeinsam in dem Hefestamm JD53 exprimiert. Im Unterschied zu den C63R-5 51-Zellen war das Wachstumsmuster der auf Uracil-freie Platten aufgetropften Hefezellen bei allen Transformanten identisch (Abb 3.9). Die N_{UI}-Versionen der ER-Membranproteine verhinderten das Wachstum der Zellen völlig, die N_{UA}- und N_{UG}-Versionen erlaubten uneingeschränktes Wachstum. Da gegen Ste14-C_{UB}-RUra3p alle ER-Membranproteine ungeachtet ihrer Funktion dasselbe Wachstumsverhalten auf Ura⁻-Platten auslösten, ist die gegen Sec63-C_{UB}-RUra3p beobachtete Nähe von Sec62p und Sec61p als spezifisch zu beurteilen und nicht auf ihre Nähe während der Translokation bzw. auf eine im Vergleich zu den anderen N_{UB}-Fusionsproteinen übermäßige Expression zurückzuführen.

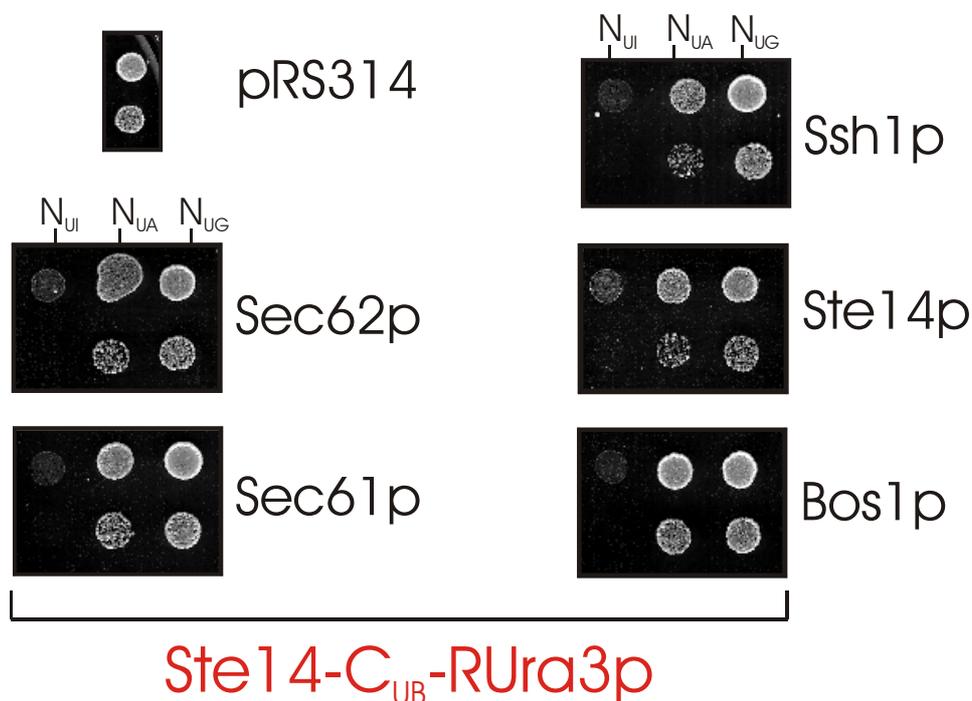


Abb 3.9: Spezifitätstest für die Interaktion von Sec63-C_{UB}-RUra3p mit Translokationskomponenten.

Interaktionstest in JD53-Zellen, die Ste14-C_{UB}-RUra3p und das Leerplasmid pRS314 enthielten oder die angegebenen N_{UB}-Fusionsproteine unter der Kontrolle des *P_{CUP1}*-Promotors exprimierten. Die Expression von Ste14-C_{UB}-RUra3p wurde durch den *P_{MET25}*-Promotor reguliert. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen und jeweils 10⁵ und 10⁴ Zellen wurden auf SD-Platten ohne Uracil aufgetropft, die 500 µM Methionin enthielten. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.5 Der Einsatz weiterer C_{UB}-Markerproteine ermöglicht die Unterscheidung zwischen Proteinen des *trans*-Golgi, der Plasmamembran und des Mitochondriums

Aus Abb 3.7 und Tab 3.1 geht hervor, dass man die im Split-Ub-Test erhaltene Antwort der mit $N_{UB-SNC1}$, $N_{UB-SSO1}$ und $N_{UB-TOM22}$ transformierten Hefen zusammenfassen kann. Alle drei N_{UI} -Fusionsproteine schränkten das Wachstum der Zellen auf Ura⁻-Platten stark ein und erlaubten unvermindertes Wachstum der N_{UA} - und N_{UG} -Transformanten. Die drei Proteine sind jedoch nicht in einem gemeinsamen Kompartiment lokalisiert. Um besser zwischen spätem Golgi-Apparat/Plasmamembran (Snc1p), Plasmamembran (Sso1p) und Mitochondrium (Tom22p) unterscheiden zu können, mussten zusätzliche C_{UB}-Markerproteine eingesetzt werden. Die Fragestellung war, ob durch die Verwendung weiterer C_{UB}-modifizierter Proteine mehr über das molekulare Umfeld der eingesetzten N_{UB} -Fusionsproteine gelernt werden könne.

3.2.5.1 Charakterisierung des mitochondrialen Kompartimentes

Um das Verhalten der $N_{UB-TOM22}$ -Transformanten zu charakterisieren, wurde das Fusionsprotein Tom20-C_{UB}-RUra3p eingesetzt. Tom20-C_{UB}-RUra3p ist funktionell (pers. Mitteilung S. Kind). Tom20p ist, wie auch Tom22p, ein Mitglied des Translokationskomplexes der äußeren Mitochondrienmembran (Übersichtsartikel: Schatz, 1997). Die folgenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit S. Müller durchgeführt. Die Koexpression von Tom20-C_{UB}-RUra3p und $N_{UB-Tom22p}$ verhinderte das Wachstum der N_{UI} -Transformanten völlig, die N_{UA} - und N_{UG} -Transformanten wuchsen ungehindert (Abb 3.10).

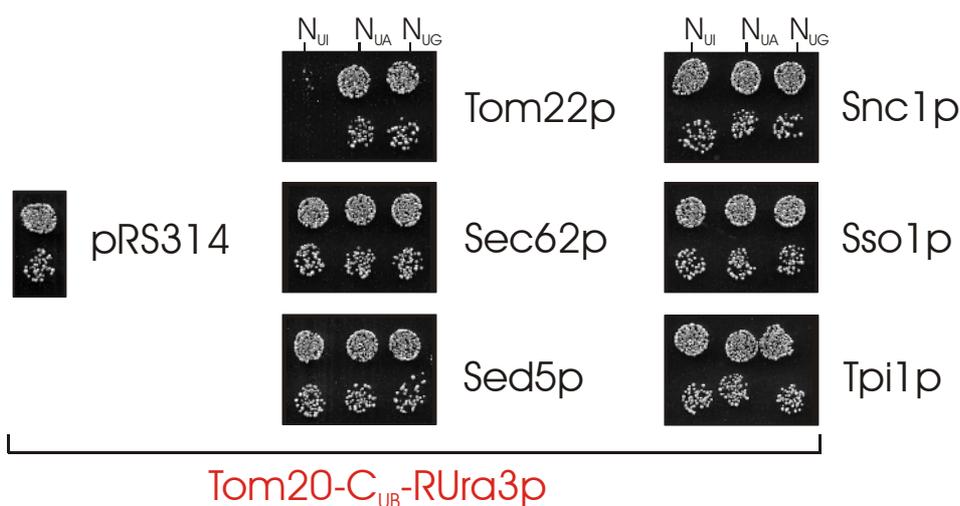


Abb 3.10: Tom20-C_{UB}-RUra3p zeigt eine spezifische Nähe zu dem mitochondrialen Protein Tom22p.

Interaktionstest in JD53-Zellen, die Tom20-C_{UB}-RUra3p und das Leerplasmid pRS314 enthielten oder die angegebenen N_{UB} -Proteine unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors exprimierten. Die Expression von Tom20-C_{UB}-RUra3p wurde durch den P_{CUP1} -Promotor reguliert. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen und jeweils 10^4 und 10^3 Zellen wurden auf SD-Platten ohne Uracil aufgetropft. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert.

Die zur Kontrolle eingesetzten N_{UB} -Fusionsproteine aus anderen Kompartimenten, Sec62p, Sed5p, Snc1p, Sso1p und Guk1p waren in keinem Fall in der Lage, das Wachstum der N_{UR} -Transformanten einzuschränken. Ich schließe daraus, dass Tom22p und Tom20p benachbart sind und das Wachstumsverhalten der Zellen sehr wahrscheinlich deren gemeinsame Lokalisation und Interaktion in der Mitochondrienmembran (Kiebler *et al.*, 1993) widerspiegelt.

3.2.5.2 Charakterisierung des späten Golgi-Kompartimentes

Zur besseren Differenzierung der Proteine, die im späten Sekretionsweg lokalisiert sind, habe ich eine C_{UB} -Fusion des Proteins Kex2p erstellt (Kex2- C_{UB} -RUra3p). Kex2p ist eine Serinprotease der Subtilisin-Familie (Fuller *et al.*, 1989a), die im *trans*-Golgi-Apparat lokalisiert ist (Franzsoff *et al.*, 1991; Redding *et al.*, 1991). Sie ist an der Reifung des α -Paarungshormons beteiligt (Julius *et al.*, 1984; Fuller *et al.*, 1988). Eine Transmembrandomäne in der Nähe ihres Carboxyterminus verankert Kex2p so in der Membran des späten Golgi-Apparates, dass ihr C-Terminus ins Cytosol reicht (Fuller *et al.*, 1988; Fuller *et al.*, 1989b). Kex2p ist für das Wachstum von Hefezellen im mitotischen Zellzyklus nicht essentiell. Die Deletion des *KEX2*-Gens führt jedoch in Hefezellen des α -Paarungstypes zur Paarungsunfähigkeit, da der α -Paarungsfaktor nicht mehr prozessiert wird (Julius *et al.*, 1984). So sind $\Delta kex2$ -Zellen des α -Paarungstypes steril, in Zellen des *a*-Paarungstypes hingegen hat die Deletion des *KEX2*-Gens keine Auswirkungen auf die Paarungseffizienz. $\Delta kex2$ -Zellen zeigen darüber hinaus einen kältesensitiven Phänotyp, und wachsen nicht unterhalb von 18°C (Martin und Young, 1989). Kex2- C_{UB} -RUra3p wurde homolog in den haploiden Hefestamm JD53 (*Mat α*) integriert, so dass die modifizierte Version die einzige *KEX2*-Genkopie darstellte (siehe 2.2.1.14.1). Der resultierende Stamm wurde CK2R-5 53 benannt. Funktionelle Kex2p-Fusionsproteine sollten die Defekte eines $\Delta kex2$ -Stammes komplementieren können.

3.2.5.2.1 Funktionalität des Kex2- C_{UB} -RUra3p-Fusionsproteins

Um die Funktionalität zu überprüfen und damit auf die korrekte Lokalisation von Kex2- C_{UB} -RUra3p schließen zu können, wurde zunächst ein $\Delta kex2$ -Stamm dargestellt. Hierbei wurde das *KEX2*-Gen im JD53-Stamm durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt (siehe 2.2.1.15). In Kanamycin-resistenten Hefekolonien wurde der Austausch des *KEX2*-Gens durch das Kanamycin-Resistenzgen mittels PCR verifiziert. Zur Bestimmung der Funktionalität des Kex2- C_{UB} -RUra3p-Fusionsproteins wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von Zellen des $\Delta kex2$ -Stammes mit demjenigen von Zellen des wt-Stammes JD53 und des Stammes CK2R-5 53 bei verschiedenen Temperaturen verglichen (Abb

3.11 A). Während bei 25°C und 30°C keine Wachstumsdefekte auftraten, war das Wachstum der $\Delta kex2$ -Zellen bei 17°C stark verlangsamt. Zellen, die Kex2-C_{UB}-RUra3p exprimierten, wuchsen hingegen genauso gut wie die JD53-Zellen mit unmodifiziertem Kex2-Protein. Eine zusätzliche Überprüfung der Funktionalität fand durch den Einsatz eines Paarungstests statt. Hierzu wurden Zellen der Stämme JD53, $\Delta kex2$ und CK2R-5 53 mit dem Paarungstester-Stamm GTY1 gepaart. GTY1 hat den komplementären Paarungstyp (*Mata*) und ist Tryptophan-autotroph. Die gewählten Selektionsbedingungen gestatteten nur das Wachstum diploider Zellen. Abb 3.11 B dokumentiert, dass nur die wt-Hefezellen sowie die das Kex2-C_{UB}-RUra3p-Fusionsprotein enthaltenden Zellen zur Paarung imstande waren. Der Paarungsversuch der $\Delta kex2$ -Zellen war erfolglos. Dieses Paarungsexperiment bestätigt die schon durch den Wachstumstest bei 17°C festgestellte Funktionalität des Kex2-C_{UB}-RUra3p. Dies lässt eine korrekte Lokalisation des Fusionsproteins im *trans*-Golgi-Kompartiment vermuten.

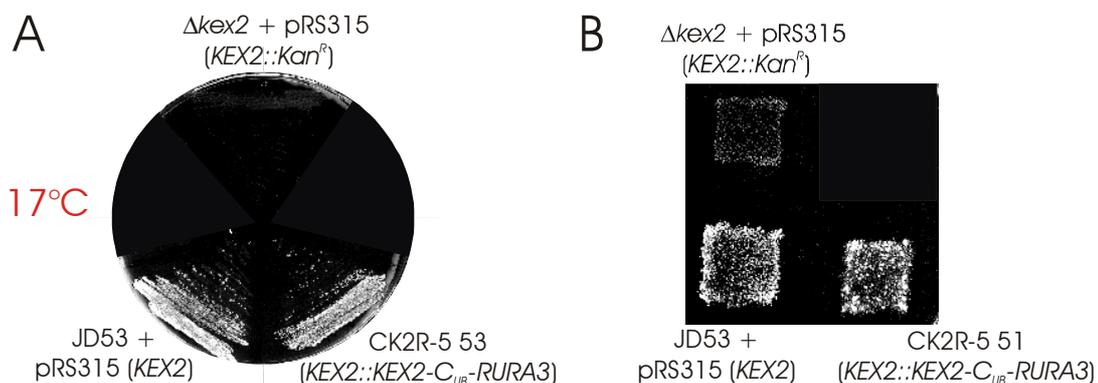


Abb 3.11: Funktionalität des Kex2-C_{UB}-RUra3p-Fusionsproteins.

(A) Test auf Kältesensitivität. Zellen der Stämme JD53 (+ pRS315), $\Delta kex2$ (+ pRS315) und CK2R-5 53 wurden in selektivem SD-Medium ohne Leucin bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden anschließend auf eine SD-Leu⁻-Platte ausgestrichen und vier Tage bei 17°C inkubiert.

(B) Paarungstest. Zellen der Stämme JD53 (+ pRS315), $\Delta kex2$ (+ pRS315) und CK2R-5 53 wurden in YPD-Medium angezogen und in Quadranten auf YPD-Platten ausgestrichen. Nach einer eintägigen Inkubationszeit wurden die Koloniefelder auf einen Rasen von 10⁷ Zellen des GTY1-Paarungstesterstammes (*Mata*, Trp⁺) umgestempelt und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Selektionsplatte, auf die replikatlattiert wurde, erlaubte nur das Wachstum von diploiden (gepaarten) Zellen (SD Leu⁻ Trp⁻-Medium).

3.2.5.2.2 Kex2p zeigt eine größere Nähe zu Snc1p als zu Sso1p

Nachdem ich in Abschnitt 3.2.5.2.1 die Funktionalität des Kex2-C_{UB}-RUra3p zeigen konnte, führte ich mit dem Stamm CK2R-5 53 Interaktionstests durch. Es wurden verschiedene N_{UB}-Fusionsproteine gemeinsam mit Kex2-C_{UB}-RUra3p exprimiert. Alle N_{UI}-Fusionsproteine inhibierten das Wachstum der Hefen vollständig, so dass eine Differenzierung zwischen den verschiedenen N_{UI}-Proteinen nicht möglich war (nicht gezeigt). Alle N_{UG}-Fusionen führten zu unvermindertem Zellwachstum auf Uracil-freien SD-Platten (nicht gezeigt). Nur die N_{UA}-Fusionen

ließen eine Differenzierung im Split-Ub-Test zu (Abb 3.12). Es ist deutlich erkennbar, dass nur die N_{UA} -Fusion des *trans*-Golgi-/Plasmamembranproteins Snc1p so effizient mit Kex2- C_{UB} -RUra3p zu interagieren vermochte, dass der Abbau des Reporters das Zellwachstum vollständig verhinderte. Das Plasmamembran-Protein Sso1p verursachte stark eingeschränktes Wachstum der Zellen. Alle anderen N_{UA} -Transformanten wuchsen ähnlich gut wie die mit einem Leervektor transformierten CK2R-5 53-Zellen. Kex2p zeigt somit die größte Nähe zu einem Protein, das zumindest partiell im späten Golgi-Kompartiment lokalisiert ist. Erstaunlicherweise konnte wiederum sehr gut zwischen *cis*- und *trans*-Golgi-Proteinen unterschieden werden (vergleiche Sed5p und Snc1p). Unerwartet war auch die fehlende Interaktion zwischen N_{UA} -Pep12p und Kex2- C_{UB} -RUra3p.

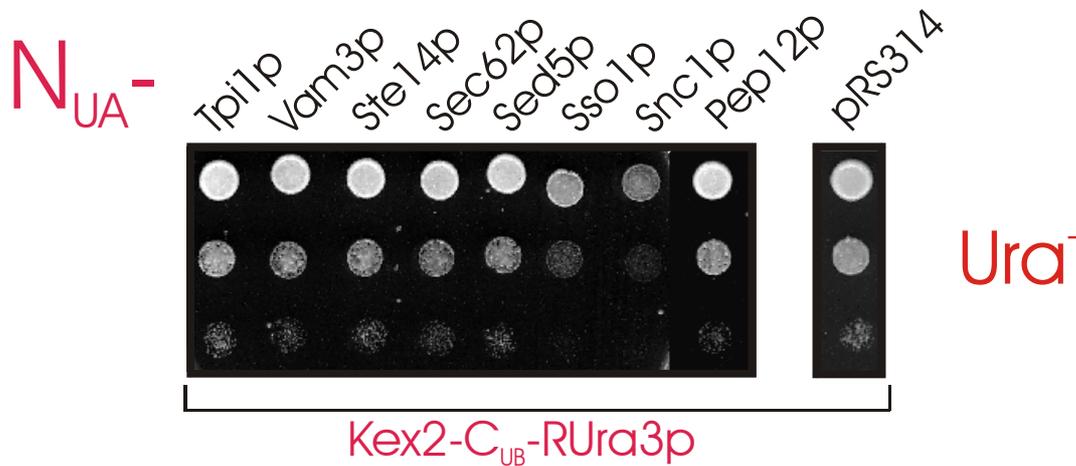


Abb 3.12: Kex2- C_{UB} -RUra3p zeigt eine spezifische Nähe zu dem *trans*-Golgi/Plasmamembran-Protein Snc1p.

Interaktionstest in Zellen, die Kex2p- C_{UB} -RUra3p und das Leerplasmid pRS314 oder die angegebenen N_{UA} -Fusionsproteine unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors exprimierten. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen und 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen wurden auf eine SD-Platte ohne Uracil aufgetropft. Die Platte wurde sieben Tage bei 25°C inkubiert.

Noch deutlicher sichtbar wurde diese Nachbarschaft, wenn der Interaktionstest auf FOA-haltigen Platten durchgeführt wurde. Hier konnte ebenfalls nur mit Hilfe der N_{UA} -Fusionen differenziert werden (Abb 3.13). Lediglich N_{UA} -Snc1p führte das beinahe vollständige Wachstum der CK2R-5 53-Zellen auf FOA-haltigem Medium herbei, für N_{UA} -SSO1-Transformanten ist noch ein Restwachstum erkennbar. Bemerkenswerterweise kann hier zum ersten Mal in einem Interaktionstest zwischen Snc1p und Sso1p unterschieden werden. Der Wachstumsunterschied der Zellen, die Snc1p bzw. Sso1p exprimierten zeigt deutlich, dass Snc1p näher an Kex2p ist als Sso1p. Im Interaktionstest mit Sec63- C_{UB} -RUra3p zeigten Snc1p und Sso1p dieselbe Distanz zu Sec63p (siehe Abb 3.7).

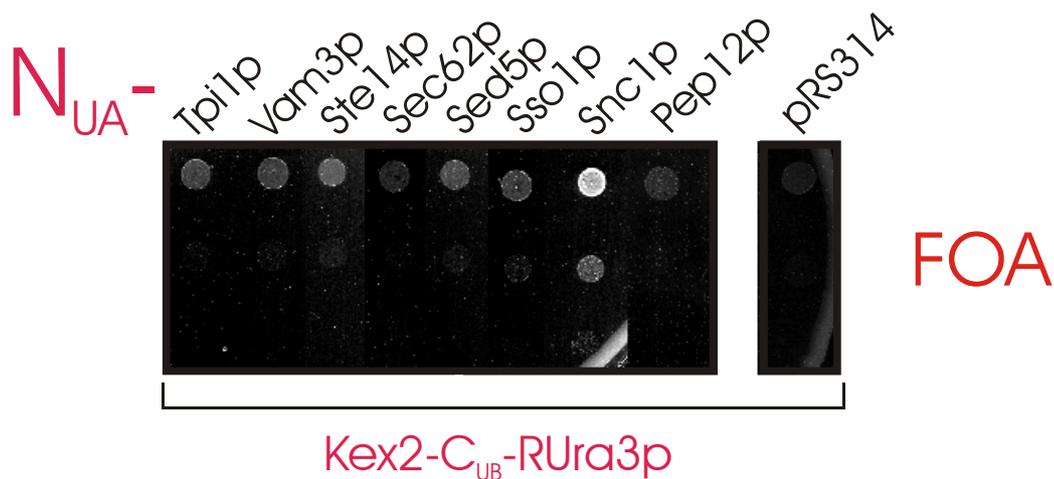


Abb 3.13: Der Einsatz von Kex2-C_{UB}-RUra3p ermöglicht die Differenzierung zwischen Snc1p und Sso1p im Interaktionstest auf FOA-haltigen Platten.

Interaktionstest in Zellen, die Kex2p-C_{UB}-RUra3p und das Leerplasmid pRS314 oder die angegebenen N_{UA-} -Fusionsproteine unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors exprimierten. Die Hefen wurden in Uracil-haltigem Medium angezogen und 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen wurden auf eine FOA-haltige SD-Platte aufgetropft. Die Platte wurde drei Tage bei 25°C inkubiert.

3.2.6 Sec63p interagiert nicht mit endosomalen, vakuolären und cytosolischen Proteinen

Keine der N_{UB} -Fusionen des endosomalen Proteins Pep12p, des vakuolären Proteins Vam3p und der cytosolischen Proteine Tpi1p bzw. Guk1p konnte das Wachstum der C63R-5 51-Zellen auf Uracil-freien Platten inhibieren (siehe Abb 3.7). Es wurden keine weiteren C_{UB}-Markerproteine eingesetzt, um eine Differenzierung dieser Proteine erreichen zu können. Deshalb ist nur die Aussage zulässig, dass diese Proteine eine größere Distanz zu Sec63-C_{UB}-RUra3p aufweisen, als alle anderen in die Messung einbezogenen N_{UB} -Fusionsproteine.

3.3 Charakterisierung der Sec63p-Bindungsdomäne im Sec62-Protein

Nachdem ich zeigen konnte, dass sich die Interaktion von Sec63p und Sec62p *in vivo* messen lässt, wollte ich durch eine Deletionsanalyse und einer neuen, auf der Split-Ub-Technik basierenden Methode versuchen, die Interaktion zwischen Sec62p und dem Sec-Komplex zu charakterisieren. Die Analyse sollte dazu dienen, strukturelle und funktionelle Domänen von Sec62p zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Deletionsmutanten des Sec62p-Moleküls konstruiert, die alle mit Dha verlängert wurden, um ihre immunologische Detektion zu ermöglichen. Der cytosolische N-Terminus des Sec62p wurde um 107 Aminosäuren ($\Delta N107$ -Dha) und um 153 Aminosäuren ($\Delta N153$ -Dha) verkürzt, so dass bei letzterem Protein nur noch 5 verbleibende aminoterminal Aminosäuren ins Cytosol ragten. Bei der vom C-Terminus ausgehenden

Verkürzung des Sec62p wurden die letzten 19 ($\Delta C19$ -Dha), 35 ($\Delta C35$ -Dha), 60 ($\Delta C60$ -Dha) und 76 ($\Delta C76$ -Dha) Aminosäuren deletiert. Bei den Mutanten $\Delta N107/\Delta C35$ -Dha und $\Delta N153/\Delta C60$ -Dha wurden die jeweiligen N- und C-terminalen Deletionen kombiniert. Schließlich erstellte ich noch ein Sec62p-Molekül, welches lediglich den cytosolischen N-Terminus und die erste Transmembrandomäne umfasste (1TM-Dha) und eines, dem beide Transmembrandomänen und der komplette C-Terminus fehlten, so dass es nur aus dem cytosolischen Aminoterminus bestand (0TM-Dha). Die Struktur der Mutanten ist in Abb 3.14 schematisch dargestellt.

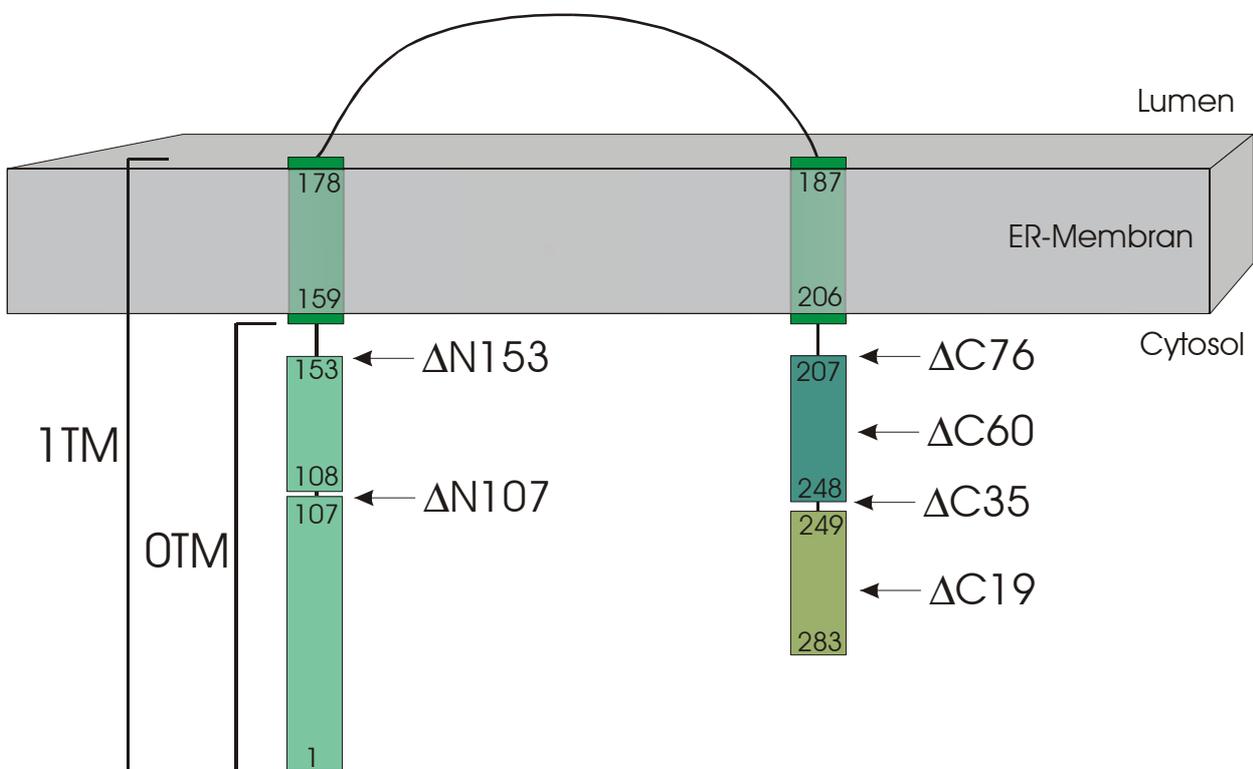


Abb 3.14: Für diese Arbeit konstruierte Sec62p-Deletionsmutanten.

Die schematische Darstellung des Sec62p-Moleküls zeigt dessen Topologie in der ER-Membran. Die Deletionsmutanten wurden durch Verkürzung der cytosolischen Termini des Sec62p dargestellt. Die Boxen in den unterschiedlichen Grüntönen kennzeichnen einzelne Domänen des Sec62p (siehe Diskussion, Abschnitt 4.3.1). Die Pfeile markieren grob die Stelle im Protein, an der die jeweilige Deletion angesetzt hat. Bei den mit „ ΔN “ bezeichneten Mutanten wurde die angegebene Anzahl Aminosäuren ausgehend vom Sec62p-Aminoterminus, bei den mit „ ΔC “ benannten diejenige vom Carboxyterminus deletiert. Außerdem wurden bei zwei Deletionsmutanten sowohl Aminosäuren des N- als auch des C-Terminus deletiert ($\Delta N107/\Delta C35$ -Dha bzw. $\Delta N153/\Delta C60$ -Dha). Die eckigen Klammern markieren die aminoterminalen Bereiche, die die Mutanten 0TM-Dha (keine Transmembrandomäne) und 1TM-Dha (eine Transmembrandomäne) umfassen.

3.3.1 Funktionalität der Sec62p-Deletionsmutanten

3.3.1.1 Darstellung eines Sec62p-Deletionsstammes

Um die Funktionalität der Deletionsmutanten des Sec62p überprüfen zu können, wurde ein $\Delta sec62$ -Stamm dargestellt. Da *SEC62* für das Wachstum der Hefezellen essentiell ist, musste die Gendeletion zunächst in einem diploiden Hefestamm (JD51) vorgenommen werden. Durch die Rekombination des Kanamycin-Resistenzgens an den *SEC62*-Genlocus (siehe 2.2.1.15) wurde eine der beiden genomischen Kopien des *SEC62* in JD51 ersetzt. Der Erfolg dieses Experimentes konnte anhand der Kanamycin-Resistenz (Kan^R) der betreffenden Hefezellen und durch analytische PCR getestet werden. Der resultierende Stamm $\Delta sec62$ -51 wurde anschließend mit dem Vektor *P_{CUP1} FLAG-SEC62-pRS316* transformiert, der das offene Leseraster von *SEC62*, welches an seinem 5'-Ende um die Sequenz des Flag-Epitops verlängert war, enthielt. Durch dieses Epitop ist das von diesem Plasmid exprimierte Flag-Sec62p auf einem Westernblot mit anti-Flag-Antikörpern nachweisbar. Flag-Sec62p ist funktionell (nicht gezeigt). Gleichzeitig kodierte das Plasmid das Enzym Ura3p, das Zellen Uracil-Prototrophie verlieh. Die $\Delta sec62$ -51 Transformanten wurden auf Ura⁻-Platten selektioniert und zur Sporulation angeregt. Nach einer Tetraden-sektion wurden die auf YPD-Medium angezogenen Sporen auf Kanamycin-haltige und auf Uracil-freie Nährplatten umgestempelt. Erwartungsgemäß erhielt ich aus einer Tetrade Sporen, die die native *SEC62*-Genkopie enthielten (Kan^S) und Sporen, bei denen *SEC62* durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt worden war (Kan^R) im Verhältnis 2:2. Das Wachstumsvermögen aller Sporen auf Uracil-freien Platten zeigte, dass sie ausnahmslos das Plasmid *P_{CUP1} FLAG-SEC62-pRS316* trugen. Ich wählte eine Sporentetrade zur weiteren Untersuchung aus. Eine PCR-Analyse konnte durch Wahl der geeigneten Oligonukleotide belegen, dass die beobachteten Phänotypen der vier Sporen mit ihren Genotypen korrelierten (nicht gezeigt). Gesamtproteinextrakte aus den vier Sporen wurden daraufhin im Westernblot mit anti-Sec62p-Antikörpern analysiert (Abb 3.15). Als Referenz wurden Zellen des wt-Stammes JD51, des Stammes $\Delta sec62$ -51 und des transformierten Stammes $\Delta sec62$ -51 + *P_{CUP1} FLAG-SEC62-pRS316* untersucht. Erwartungsgemäß konnte nur in den diploiden Hefestämmen sowie in den zwei Kanamycin-sensitiven Sporen das native Sec62p nachgewiesen werden. Das Flag-modifizierte Sec62p wurde in allen Stämmen außer dem wt-JD51 und dem untransformierten $\Delta sec62$ -51 detektiert.

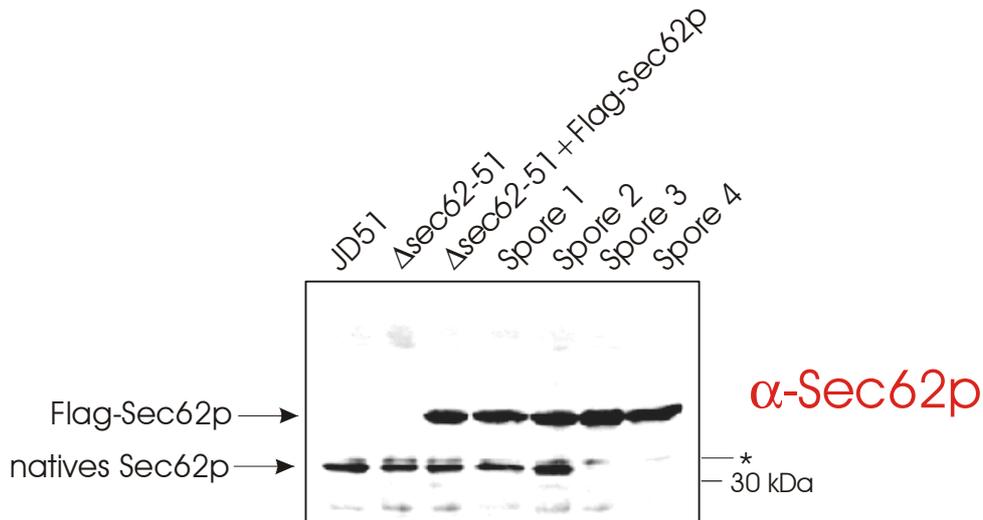


Abb 3.15: Westernblot-Analyse einer Sporentetrate, die aus der Sporulation des mit P_{CUP1} FLAG-SEC62- $pRS316$ transformierten Hefestammes $\Delta sec62-51$ hervorgegangen ist.

Es wurden Gesamtproteinextrakte aus den folgenden Hefen gewonnen: JD51 ($SEC62/SEC62$), $\Delta sec62-51$ ($SEC62/SEC62::Kan^R$), $\Delta sec62-51$ ($SEC62/SEC62::Kan^R P_{CUP1}$ FLAG-SEC62- $pRS316$), Spore 1 ($SEC62 P_{CUP1}$ FLAG-SEC62- $pRS316$), Spore 2 ($SEC62 P_{CUP1}$ FLAG-SEC62- $pRS316$), Spore 3 ($SEC62::Kan^R P_{CUP1}$ FLAG-SEC62- $pRS316$), Spore 4 ($SEC62::Kan^R P_{CUP1}$ FLAG-SEC62- $pRS316$). Diese wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf einem Westernblot mit anti-Sec62p-Antikörpern behandelt. *: Sec62p-kreuzreagierende Bande.

Eine Spore des gewünschten Phänotypes (Kan^R , Ura^+) und Genotypes ($SEC62::Kan^R P_{CUP1}$ FLAG-SEC62- $pRS316$) wurde daraufhin für die weitere Arbeit ausgewählt (Hefestamm: $\Delta sec62-F62$).

3.3.1.2 Der gesamte N-Terminus und der äußerste C-Terminus des Sec62p sind nicht essentiell

Im nachstehenden Funktionalitätstest wurde auf FOA-haltigen Nährplatten überprüft, welche der Sec62p-Deletionsmutanten es dem $\Delta sec62-F62$ -Stamm erlaubte, das Plasmid-kodierte Flag-Sec62p zu verlieren (Plasmid-Shuffling). Dies konnte nur unter den Umständen geschehen, dass das mutierte Protein allein das Überleben der Zellen dieses Stammes sicherstellte. Die unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors stehenden, kodierenden Sequenzen der Sec62p-Deletionsmutanten wurden in den Stamm $\Delta sec62-F62$ transformiert. Zusätzlich wurden als negative Kontrolle ein Leerplasmid, als positive Kontrolle die native $SEC62$ -Genkopie sowie $SEC62-DHA$ transformiert. Außerdem wurden ebenfalls JD53-Zellen, die P_{CUP1} FLAG-SEC62- $pRS316$ und aus Selektionsgründen das leere Plasmid $pRS314$ enthielten, eingesetzt. Um den Hefen die Möglichkeit zu geben, den das Flag-Sec62p kodierenden Vektor zu verlieren, wurden sie zwei Tage in Uracil-haltigem SD-Medium inkubiert. Nur die Zellen, die eine funktionelle Sec62p-Version trugen, sollten den Vektor P_{CUP1} FLAG-SEC62- $pRS316$ entbehren können. Der Verlust des $Ura3p$ kodierenden Plasmides ist die Voraussetzung für eine FOA-Resistenz der Zellen. Die

Transformanten wurden auf FOA-haltige Platten ausgestrichen und das Wachstum der Hefen nach einer dreitägigen Inkubationsdauer bei 25°C analysiert. Um auszuschließen, dass die Proteinnengen der einzelnen Deletionsmutanten für das Wachstum der Transformanten limitierend sein würden, wurde der Funktionalitätstest in Anwesenheit von 100 μM CuSO_4 durchgeführt. Ein Wachstum der Zellen auf FOA-haltigen Platten weist auf die Expression eines funktionellen Sec62p-Deletionsproteins hin.

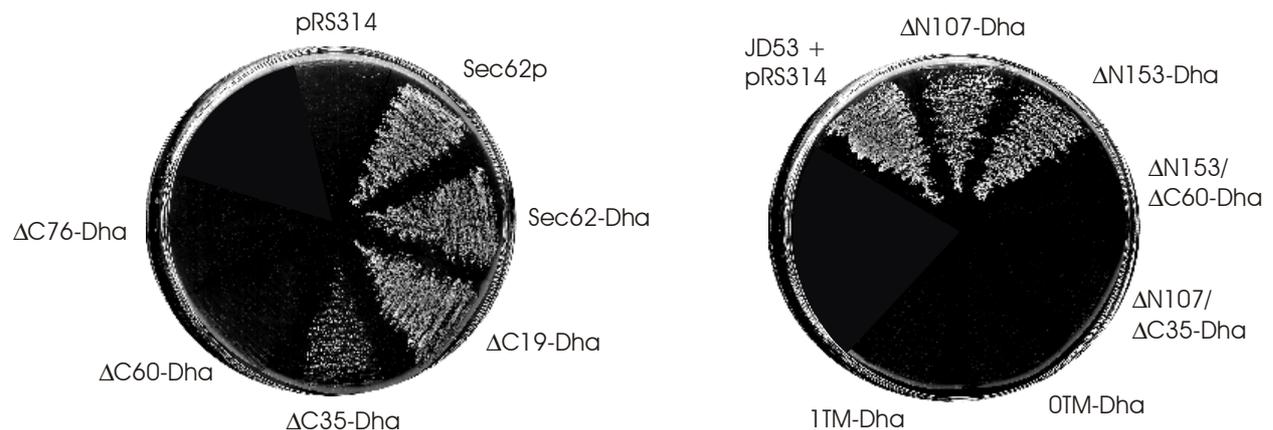


Abb 3.16: Funktionalitätstest der Sec62p-Deletionsmutanten (Plasmid-Shuffle-Experiment).

Die unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors stehenden angegebenen Sec62p-Deletionsmutanten wurden im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 exprimiert. Nach einer zweitägigen Inkubationszeit in Uracil-haltigem SD-Medium wurden 10^6 Zellen der Transformanten auf CuSO_4 - und FOA-haltige Nährplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 25°C inkubiert. FOA-Resistenz der Zellen weist auf die Expression eines funktionellen Sec62p-Deletionsproteins hin.

Aus Abb 3.16 ist ersichtlich, dass die JD53-Zellen, die aufgrund ihrer nativen $SEC62$ -Genkopie das P_{CUP1} $FLAG$ - $SEC62$ - $pRS316$ entbehren konnten, als Positivkontrolle das erwartete gute Wachstum auf FOA-haltigen Platten zeigten. Die $\Delta sec62$ -F62-Zellen, die nur ein Leerplasmid enthielten, waren dagegen nicht in der Lage, das Flag-Sec62p exprimierende Plasmid zu verlieren und konnten auf FOA-haltigem Medium nicht wachsen. Die Zellen, die das unmodifizierte Sec62p und das Sec62-Dha exprimierten, konnten erwartungsgemäß auf FOA-haltigem Medium wachsen. Beide N-terminalen Deletionsmutanten ($\Delta N107$ -Dha, $\Delta N153$ -Dha) verhalfen den $\Delta sec62$ -F62-Zellen zu FOA-Resistenz. Da sie nach dem Verlust des Flag-Sec62p die einzigen Sec62-Proteine in diesen Hefen darstellen sollten, sind $\Delta N107$ -Dha und $\Delta N153$ -Dha funktionell. Die Funktionalität von $\Delta C19$ -Dha und $\Delta C35$ -Dha konnte ebenfalls demonstriert werden. Allerdings war das Wachstum der Zellen, die $\Delta C35$ -Dha exprimierten, bereits stark eingeschränkt (Abb 3.16). Die FOA-Sensitivität aller anderen Transformanten signalisierte die Unfähigkeit aller übrigen Sec62p-Deletionsproteine, die Funktion des wt-Sec62p übernehmen zu können. Um auszuschließen, dass diese Proteine nur deshalb keine FOA-Resistenz vermitteln konnten,

weil sie nicht oder in zu geringem Maße exprimiert wurden, kontrollierte ich ihre Anwesenheit auf einem Westernblot. Von allen $\Delta sec62$ -F62-Transformanten sowie von den FOA-resistenten Hefen wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, die auf einem Immunblot mit anti-ha-Antikörpern behandelt wurden. Abb 3.17 belegt, dass alle Deletionsmutanten auch ohne Induktion des P_{CUP1} -Promotors synthetisiert wurden. $\Delta C35$ -Dha wurde vor der FOA-Selektion schwächer als die übrigen funktionellen Sec62-Proteine exprimiert. In den FOA-resistenten Hefen, in denen $\Delta C35$ -Dha das einzige Sec62-Protein ist, wird sein Expressionsniveau drastisch erhöht (Abb 3.17, vergl. Spalte 5 und 6). Auch die Proteinmenge der Doppelmutante $\Delta N107/\Delta C35$ -Dha war in Abwesenheit von $CuSO_4$ sehr gering. Durch Induktion des P_{CUP1} -Promotors konnte die Proteinmenge stark erhöht werden (Abb 3.17, vergl. Spalte 16 und 17). Die FOA-Sensitivität dieser Transformanten ist somit auf die mangelnde Funktionalität des $\Delta N107/\Delta C35$ -Dha und nicht auf die fehlende Expression oder den schnellen Abbau des Proteins zurückzuführen.

Das wt-Sec62-Dha und die C-terminalen Deletionsproteine wurden im Westernblot stets - mehr oder weniger stark ausgeprägt - als Doppelbanden (Abb 3.17, Spalten 1-8; 14, 15) detektiert. Der Ursprung der im Gel schneller laufenden Fraktion könnte in einem zweiten Initiations-ATG liegen, welches die Translation eines um 9 Aminosäuren (ca. 1 kDa) kürzeren Proteins bewirkt. Für diese Theorie spricht, dass die Doppelbanden nicht bei den N-terminalen Mutanten auftraten. Auch Deshaies und Schekman konnten eine solche Doppelbande beim wt-Sec62p beobachten (Deshaies und Schekman, 1990).

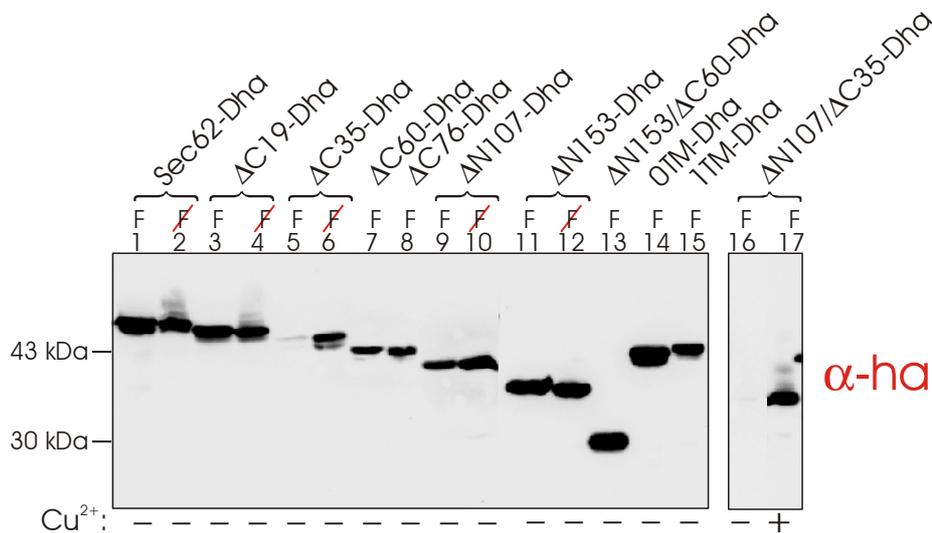


Abb 3.17: Expressionsniveaus der verschiedenen Sec62-Proteine im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62.

Die P_{CUP1} -Promotor kontrollierten Sec62p-Deletionsmutanten und das wt-Sec62-Dha wurden im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 ohne (-) oder mit (+) Zugabe von $CuSO_4$ exprimiert. Es wurden von den Transformanten Gesamtproteinextrakte hergestellt, bevor sie auf FOA-haltige Platte ausgestrichen wurden und das Flag-Sec62p exprimierende Plasmid noch in den Zellen vorhanden war (F). Die Proteine der Transformanten, die auf FOA-haltigen Platten

wachsen konnten und somit kein *FLAG-SEC62* mehr enthielten (F) wurden ebenfalls extrahiert. Die Extrakte wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit anti-ha-Antikörpern nachgewiesen.

Die Anwesenheit des Flag-Sec62p vor der Ausplattierung der $\Delta sec62$ -F62-Transformanten auf FOA-haltige Nährplatten konnte auf einem mit anti-Flag-Antikörpern behandelten Westernblot nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Abwesenheit des Flag-Sec62p nach dem Wachstum der $\Delta sec62$ -F62-Zellen auf den FOA-haltigen Platten wurde ebenfalls durch einen Immunblot bestätigt (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde der Genotyp dieser Hefezellen durch eine analytische PCR überprüft (nicht gezeigt).

Aus dem Funktionalitätstest lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Der cytosolische N-Terminus des Sec62p ist für seine Funktion nicht essentiell. Auch die letzten 35 Aminosäuren des Sec62p-Carboxyterminus können ohne funktionelle Einbußen deletiert werden. Die Verkürzung beider Sec62p-Termini ($\Delta C35/\Delta N107$ -Dha) wird jedoch nicht mehr toleriert. Da die über 35 Aminosäuren hinausgehende Deletion des Sec62p-Carboxyterminus zu nicht funktionellen Proteinen ($\Delta C60$ -Dha, $\Delta C76$ -Dha, 0TM-Dha, 1TM-Dha) führt, liegt zwischen Aminosäure 248 und 158 die essentielle Domäne des Proteins.

3.3.2 N- und C-Terminus des Sec62p binden an den Sec-Komplex

Inwieweit sind die verschiedenen Sec62p-Deletionsmutanten noch in der Lage, an den Sec-Komplex zu binden? Ich versuchte, diese Frage mit Hilfe eines Konkurrenzexperimentes zu beantworten (siehe auch Abschnitt 3.1.3). Zellen des Stammes C63R-5 51 wurden mit dem Konstrukt *P_{CUP1} N_{UG}-SEC62* transformiert. Zusätzlich exprimierten die Zellen die verschiedenen Sec62p-Deletionsmutanten unter der Kontrolle des induzierbaren *P_{GALI}*-Promotors. Als Referenzen wurden statt der Deletionsmutanten das ER-Membranprotein Ste14-Dha sowie das cytosolische Tpi1-ha eingesetzt. Wie schon in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, sollte die erfolgreiche Konkurrenz eines Deletionsproteins zur Uracil-Prototrophie der entsprechenden Transformanten führen. Eine Unfähigkeit der Transformanten, auf Uracil-freien Platten zu wachsen, zeigt dagegen das Unvermögen der exprimierten Sec62p-Deletionsmutanten, N_{UG}-Sec62p vom Sec-Komplex zu verdrängen (Abb 3.18).

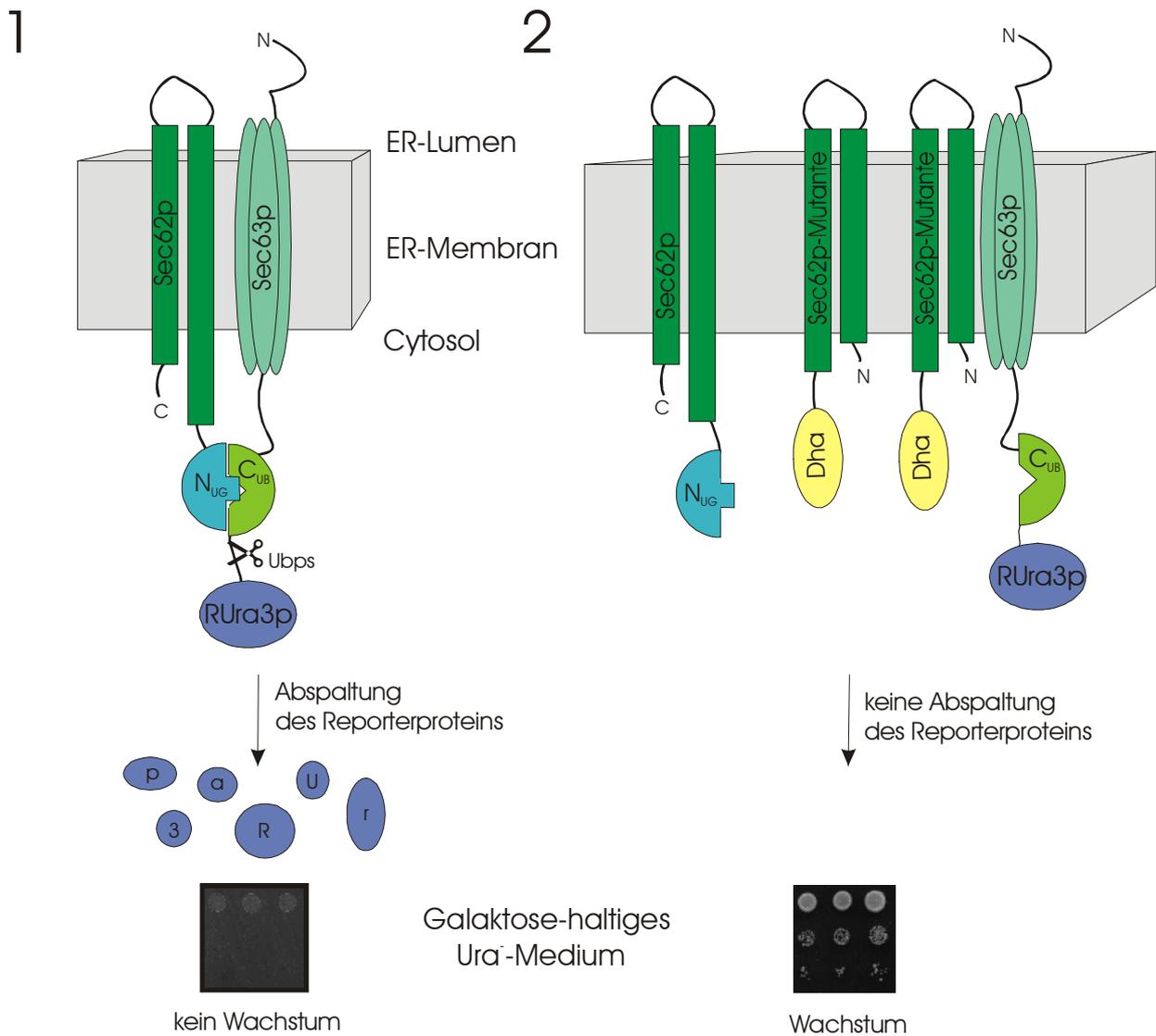


Abb 3.18: Modell der Konkurrenz zwischen den Sec62p-Deletionsmutanten und N_{UG} -Sec62p um Sec63- C_{UB} -RUra3p.

Sec63- C_{UB} -RUra3p wird gemeinsam mit dem unter der Kontrolle des Kupferpromotors exprimierten N_{UG} -Sec62p exprimiert. Zusätzlich wird ein Dha-modifiziertes Sec62p-Deletionsprotein, dessen Expression durch den P_{GALI} -Promotor kontrolliert wird, synthetisiert. Wachsen die Zellen auf Galaktose-haltigem Medium, ist das Dha-modifizierte Sec62p-Deletionsprotein in der Zelle in großem Überschuss vorhanden. Wenn es noch an den Sec-Komplex binden kann, verdrängt es das N_{UG} -Sec62p aus dem Komplex, so dass die Reassoziierung von N_{UB} und C_{UB} weniger häufig stattfindet. Die geringere Abspaltung des RUra3p führt zu besserem Zellwachstum auf Ura⁻-Platten.

Alle Transformanten waren erwartungsgemäß nicht fähig, auf Glukose-haltigen Ura⁻-Platten, also bei Repression der P_{GALI} -Promotor kontrollierten Konstrukte zu wachsen (nicht gezeigt). Aus Abb 3.19 ist erkennbar, dass nur die Zellen, die das intakte Sec62-Dha und diejenigen, die $\Delta C19$ -Dha exprimierten auf Uracil-freien Galaktose-haltigen Nährplatten wachsen konnten. Von allen Deletionsmutanten ist offensichtlich nur $\Delta C19$ -Dha in der Lage, das N_{UG} -modifizierte Sec62p effizient genug aus dem heptameren Sec-Komplex zu verdrängen.

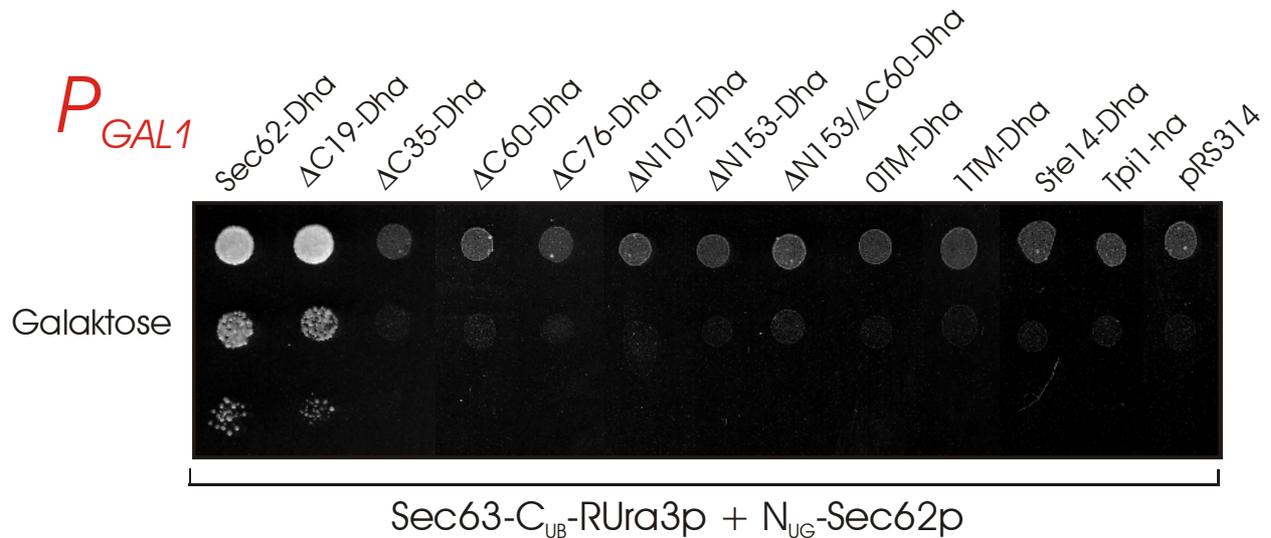


Abb 3.19: Sec62-Dha und Δ C19-Dha können im Stamm C63R-5 51 das N_{UG}-Sec62p aus dem Sec-Komplex verdrängen.

Die unter der Kontrolle des *P_{GAL1}*-Promotors stehenden, angegebenen Sec62p-Deletionsproteine wurden im Hefestamm C63R-5 51, der zusätzlich *P_{CUP1} N_{UG}-SEC62-pRS313* enthielt, exprimiert. Zusätzlich wurden auch Zellen untersucht, die statt der Deletionsmutanten das Leerplasmid pRS314, *STE14-DHA* oder *TPI1-HA* enthielten. Nach Anzucht in Uracil- und Galaktose-haltigem SD-Medium wurden die Transformanten auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausplattiert und für 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Die gute Expression aller Sec62-Dha-Konstrukte unter induzierenden Bedingungen (Abb 3.20) und ihre Abwesenheit unter reprimierenden Bedingungen (nicht gezeigt) wurde auf einem Westernblot mit anti-ha-Antikörpern bestätigt.

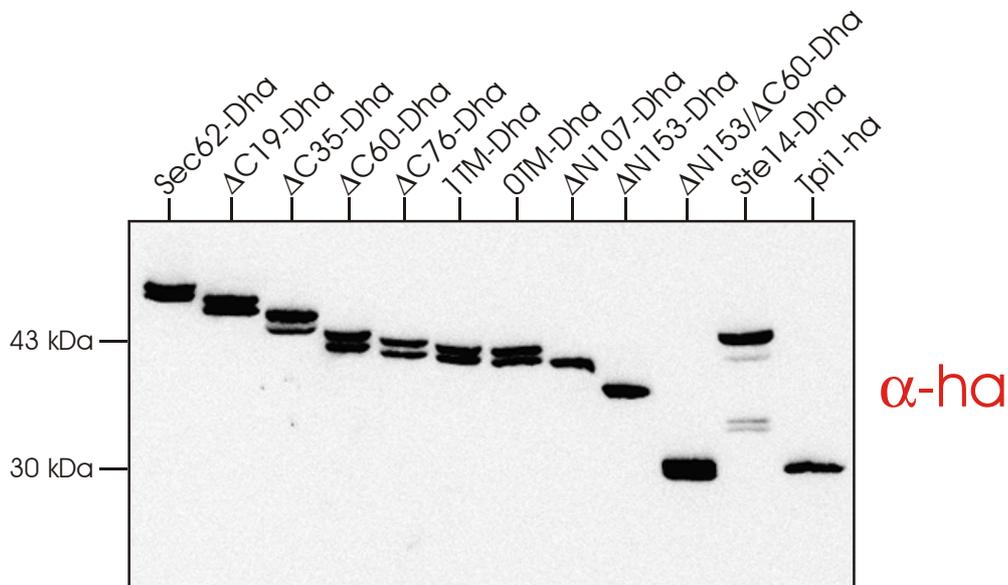
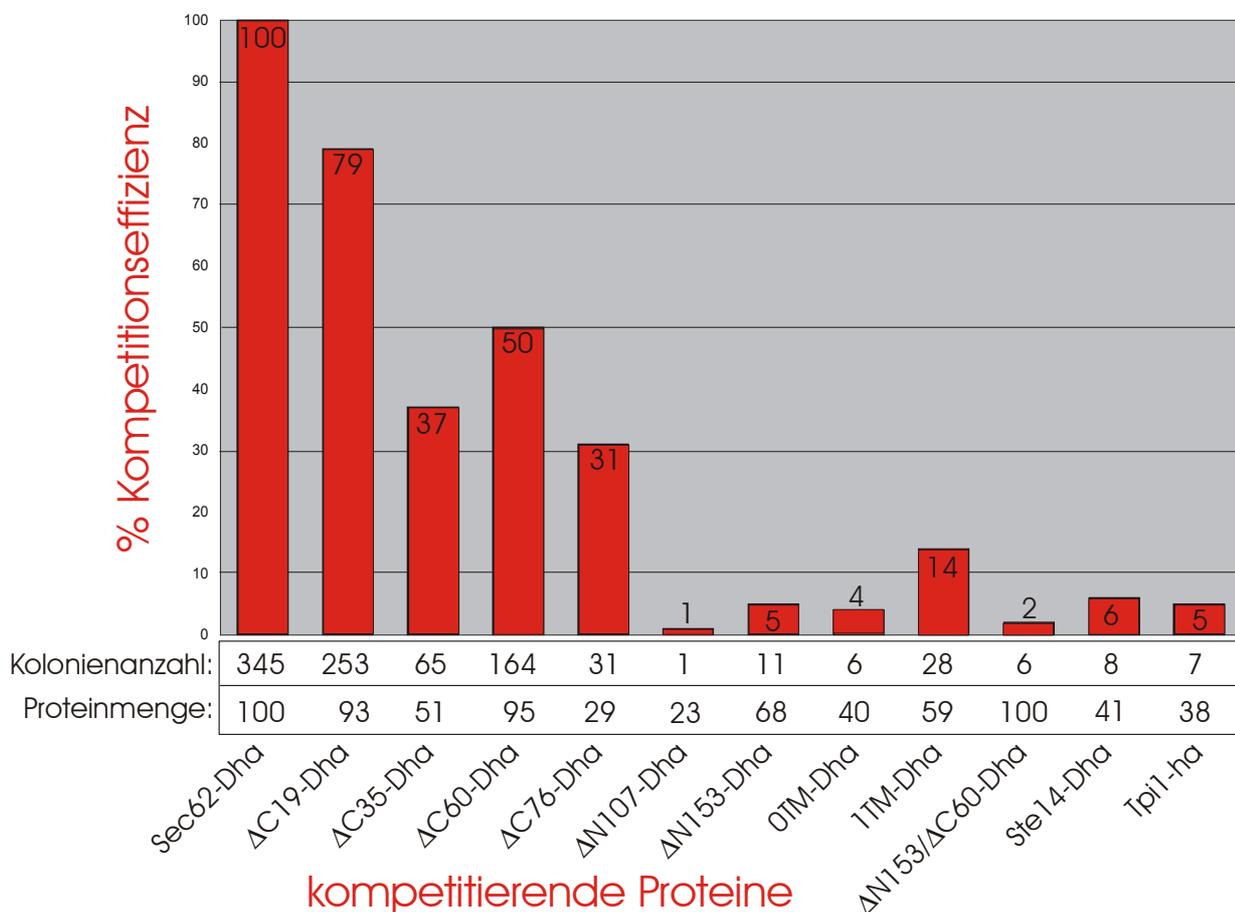


Abb 3.20: *P_{GAL1}*-Promotor gesteuerte Expression der Sec62p-Deletionsmutanten.

Zellen des Stammes C63R-5 51, die N_{UG}-Sec62p unter der Kontrolle des Kupferpromotors und zusätzlich unter dem *P_{GAL1}*-Promotor die angegebenen Sec62p-Deletionsmutanten exprimierten, wurden in Galaktose-haltigem Medium angezogen. Zusätzlich wurden Zellen analysiert, die als kompetitierende Proteine statt der Deletionsmutanten Ste14-Dha oder Tpi1-ha exprimierten. Nach Herstellung von Gesamtproteinextrakten und deren Auftrennung durch SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-ha-Antikörpern behandelt.

Zur semiquantitativen Analyse der Konkurrenz wurden jeweils etwa 10^4 Zellen der einzelnen Transformanten auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausplattiert und die nach einer Woche gebildeten Kolonien gezählt. Im Diagr. 1 ist das Ergebnis für die einzelnen Transformanten aufgetragen. Da die Expressionsniveaus der mutierten Proteine leicht variierten (siehe Abb 3.20) und die Konkurrenzeffizienz stark von der Konzentration des jeweiligen konkurrierenden Proteins abhängt, wurden im Diagr. 1 die gezählten Kolonienzahlen auf die aus dem Immunblot (Abb 3.20) quantifizierten Proteinmengen genormt (siehe 2.2.3.2). Für die im Diagr. 1 gezeigten Ergebnisse wurden die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Auszählungen und der Mittelwert aus zwei Westernblot-Quantifizierungen verwendet.



Diagr. 1: Konkurrenzeffizienz der Sec62-Deletionsproteine.

Etwa 10^4 Zellen der *P_{CUP1} NUG-SEC62-pRS313* enthaltenden, angegebenen C63R-5 51-Transformanten wurden auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausgestrichen und die Anzahl der nach sieben Tagen bei 30°C gewachsenen Kolonien wurde gezählt. Die Anzahl der Kolonien wurde auf die Expressionsniveaus der Proteine angeglichen. Die Kolonienanzahl sowie die aus der Westernblot-Quantifizierung erhaltenen Werte (relative Proteinmengen) sind aufgeführt. Die gezeigten Werte mitteln sich aus fünf unabhängigen Auszählungen und zwei Westernblot-Quantifizierungen. Der für Sec62-Dha erhaltene Wert wurde willkürlich auf 100 gesetzt. Die relative Konkurrenzeffizienz der Deletionsproteine ist an den Balken angegeben.

Zunächst fällt ins Auge, dass sich Sec62-Dha und Δ C19-Dha deutlich von den übrigen Mutanten abheben. Bei ihnen habe ich die höchsten Kolonienzahlen gezählt. Dies stimmt mit dem im Wettbewerbstest beobachteten Wachstum der Transformanten auf Galaktose-haltigen Ura⁻-Platten überein (Abb 3.19). Bei Δ C19-Dha sank die Wettbewerbseffizienz bezüglich Sec62-Dha jedoch schon um ca. 20%, so dass die Deletion der letzten 19 Aminosäuren wahrscheinlich bereits Auswirkungen auf die Bindungseffizienz an den Sec-Komplex hat. Die Werte der folgenden drei carboxyterminalen Deletionsmutanten Δ C35-Dha, Δ C60-Dha und Δ C76-Dha liegen so nah beieinander, dass man die Proteine in eine Gruppe zusammenfassen kann. Die Wettbewerbseffizienz ist etwa 30-50% geringer als die für Sec62-Dha ermittelte. Dennoch heben sich diese drei Transformanten ganz offensichtlich noch von allen übrigen Mutanten ab, die alle weniger als 15% des wt-Wertes erreichen und damit im Rahmen der Kontrollen (Ste14-Dha und Tpi1-ha) liegen. Eine Ausnahme bildet möglicherweise 1TM-Dha, dessen Werte gering aber reproduzierbar über den Hintergrundwerten liegen. Betrachtet man schließlich die vom N-Terminus ausgehenden Deletionsproteine Δ N107-Dha und Δ N153-Dha, so ist für sie keine Wettbewerb mehr erkennbar. Die Deletion des Sec62p-Aminoterminus führt somit zu einer starken Beeinträchtigung der Bindung an den Sec-Komplex.

Ich schließe aus den geschilderten Ergebnissen, dass es innerhalb des Sec62p-Moleküls zwei Bereiche gibt, die an den Sec-Komplex binden können. Die erste Bindungsstelle liegt im cytosolischen, N-terminalen Bereich von Sec62p, denn die ersten 107 Aminosäuren des Sec62p-Aminoterminus sind für die Bindung essentiell. Wird dieser oder ein noch größerer N-terminaler Bereich (Δ N153-Dha) deletiert, findet keine Wettbewerb des mutanten Proteins mit N_{UG}-Sec62p statt. Hierbei ist es nicht von Belang, ob noch zusätzlich ein C-terminaler Bereich des Sec62p-Moleküls entfernt wird (vergl. im Diagr. 1 die Wettbewerbseffizienz von Δ N153-Dha mit Δ N153/ Δ C60-Dha). Der zweite Bindungsbereich umfasst die letzten 35 Aminosäuren des Sec62p-Carboxyterminus. Deletiert man diesen (Δ C35-Dha), sinkt die Wettbewerbseffizienz der Transformante auf 37% des wt-Wertes ab. Jede zusätzliche Verkürzung des cytosolischen C-Terminus (Δ C60-Dha, Δ C76-Dha) führt zu keiner weiteren Beeinflussung der Bindung an den Sec-Komplex. Innerhalb des 35 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Bindungsbereichs scheinen die letzten 19 Aminosäuren des Sec62p weniger wichtig für die Bindung zu sein als die darauf folgenden restlichen 16 Aminosäuren. Insgesamt scheint die durch diese C-terminale Region vermittelte Bindung an den Sec-Komplex von geringerer Bedeutung als die des N-Terminus zu sein. Wird nämlich der Bindungsbereich des N-Terminus entfernt, verhindert dies vollständig die Wettbewerb, wird derjenige des C-Terminus entfernt, kann noch eine Restwettbewerb stattfinden. Da es bei der Verkürzung des Sec62p-Carboxyterminus um insgesamt 99 Aminosäuren,

resultierend in 1TM-Dha, wieder zu einem Einbruch der Konkurrenzeffizienz kommt, gibt es möglicherweise einen dritten Bindungsbereich im Sec62p, der von der zweiten Transmembrandomäne gebildet wird.

Obwohl die Hauptbindungsstelle an den Sec-Komplex also von dem N-terminalen Bereich des Sec62p gebildet wird, kann das aminoterminal, cytosolische Sec62p-Peptid allein (0TM-Dha) N_{UG} -Sec62p nicht messbar aus dem Komplex verdrängen. Dies liegt wahrscheinlich an der geringen lokalen Konzentration dieses cytosolischen Moleküls an der ER-Membran. Da der Verlust der Bindung nach Deletion eines Abschnitts im Protein nicht notwendigerweise bedeutet, dass diese Region eine autonome Bindungsstelle ist, musste für die N-terminale Domäne ein positiver Bindungsnachweis erbracht werden. Um die Interaktion von Sec63p und 0TM-Dha sensitiver messen zu können, wurde im Folgenden ein direkter Split-Ub-Test durchgeführt.

3.3.3 Der direkte Split-Ub-Test bestätigt die Konkurrenzergebnisse

Sec62-Dha und die Mutanten $\Delta C19$ -Dha, $\Delta C35$ -Dha, $\Delta C60$ -Dha, $\Delta N107$ -Dha und 0TM-Dha wurden an ihrem N-Terminus mit N_{UB} verlängert. Anschließend wurden sie im Stamm C63R-5 51 unter der Kontrolle des Kupferpromotors exprimiert. Als Referenzen wurden das Leerplasmid pRS314 und N_{UB} -GUK1 in diesen Stamm transformiert und in die Analyse eingeschlossen. Die Transformanten wurden auf SD-Ura⁻-Platten aufgetropft. In diesem Test zeigt fehlendes Wachstum der Hefen eine Interaktion der koexprimierten Fusionsproteine an. Der Grad der Uracil-Prototrophie der Zellen ist in Abb 3.21 dargestellt. Das Wachstum aller Transformanten wurde durch die Expression der N_{UI} -Versionen der Deletionsmutanten verhindert. Nur die Kontrollzellen, die N_{UI} -Guk1p enthielten, zeigten gutes Wachstum auf Ura⁻-Platten. Selbst die Affinität von N_{UI} -0TM-Dha zu Sec63- C_{UB} -RUra3p war so groß, dass das Reporterprotein komplett abgespalten und abgebaut wurde. Ein für N_{UI} - $\Delta N107$ -Dha exprimierende Zellen zu erahnendes Restwachstum prägte sich bei Expression der N_{UA} -Version zu einem uneingeschränkten Wachstum der Zellen aus. N_{UA} -0TM-Dha dagegen schränkte, ähnlich wie die N_{UA} -Varianten aller C-terminalen Mutanten, die Lebensfähigkeit der Zellen deutlich ein. Alle C63R-5 51-Hefen, die N_{UG} -Fusionen der Deletionsmutanten exprimierten, wuchsen auf Uracil-freien Platten. Allerdings wuchsen die N_{UG} - $\Delta N107$ -DHA- und N_{UG} -0TM-DHA-Transformanten eindeutig besser als die übrigen N_{UG} -Fusionen der Deletionsproteine auf den Nährplatten.

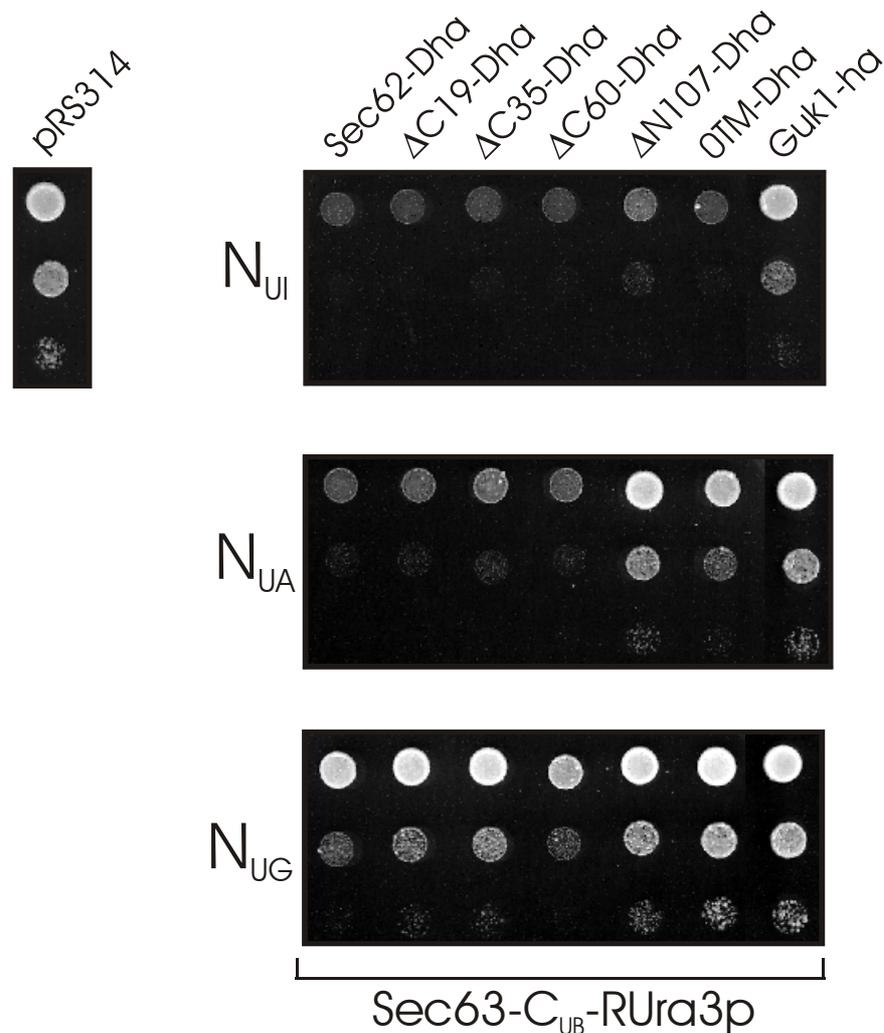


Abb 3.21: 0TM-Dha zeigt eine größere Nähe zu Sec63p als ΔN107-Dha.

Die unter der Kontrolle des *P_{CUP1}*-Promotors stehenden angegebenen N_{UB}-Sec62p-Deletionsmutanten wurden im Hefestamm C63R-5 51 exprimiert. Zusätzlich wurden auch C63R-5 51-Zellen untersucht, die das Leerplasmid pRS314 oder N_{UB}-*GUK1-HA* enthielten. Nach Anzucht in Uracil-haltigem SD-Medium wurden 10⁶, 10⁵ und 10⁴ Zellen der Transformanten auf Ura⁻-Platten aufgetropft und für 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Der direkte Split-Ub-Interaktionstest unterstützt die Ergebnisse des Wettbewerbstests. Die N_{UB}-Fusionen der carboxyterminalen Deletionsmutanten ΔC19-Dha, ΔC35-Dha und ΔC60-Dha sind in ihrer Nähe zu Sec63-C_{UB}-RUra3p mit dem wt-Sec62-Dha vergleichbar. Allerdings inhibiert auch in diesem Test die C-terminale Dha-Extension die Bindung des Sec62p an den Komplex (vergleiche N_{UG}-Sec62p in Abb 3.6 A und N_{UG}-Sec62-Dha in Abb 3.21). N_{UB}-ΔN107-Dha zeigt keine größere Nähe zu Sec63-C_{UB}-RUra3p als ER-Membranproteine, die nicht an der Translokation beteiligt sind (siehe Abb 3.7). Dies korreliert mit dem Ergebnis der Wettbewerbstudie dieses Deletionsproteins. Im Gegensatz dazu demonstriert das Experiment deutlich die Fähigkeit des N_{UB}-0TM-Dha, besser an den Sec-Komplex zu binden als N_{UB}-ΔN107-Dha und als das eben-

falls cytosolisches Protein N_{UB} -Guk1-ha. Letztere interessante Beobachtung versuchte ich im Folgenden durch ein weiteres Konkurrenzexperiment zu bestätigen.

3.3.4 Die C-terminalen Deletionsmutanten sind durch Überexpression des Sec62p kompetitierbar

Die Spezifität der gemessenen Interaktion von N_{UB} -OTM-Dha und Sec63- C_{UB} -RUra3p wurde wiederum durch ein Konkurrenzexperiment überprüft. Hierzu wurden diejenigen N_{UB} -Versionen der Deletionsmutanten ausgewählt, die bei Koexpression mit Sec63- C_{UB} -RUra3p dazu führten, dass die Zellen nicht mehr auf Ura⁻-Platten wachsen konnten. Dies waren N_{UA} - Δ C35-Dha, N_{UA} - Δ C60-Dha und die N_{UI} -Version des Δ N107-Dha. Für OTM-Dha wurde der Versuch sowohl mit der N_{UI} - als auch mit der N_{UA} -Variante durchgeführt. Als Negativkontrolle diente N_{UI} -Guk1p. Die N_{UB} -Fusionsproteine wurden gemeinsam mit Sec63- C_{UB} -RUra3p exprimiert. Die Hefezellen enthielten zusätzlich ein von dem P_{GALI} -Promotor exprimiertes Sec62p. Als Referenz wurde in die Hefen statt des P_{GALI} *SEC62-pRS314* ein Leerplasmid transformiert. Wurden die verschiedenen Transformanten auf Glukose-haltige Ura⁻-Nährplatten aufgetropft, so bestand kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Zellen, die das Leerplasmid oder das Sec62p kodierende Plasmid enthielten. Wurde der Interaktionstest jedoch auf Galaktose-haltigen Ura⁻-Platten durchgeführt und dadurch die Expression des kompetitierenden Sec62p bewirkt, bewies das verbesserte Wachstum der Zellen, die N_{UA} - Δ C35-Dha, N_{UA} - Δ C60-Dha und N_{UI} - bzw. N_{UA} -OTM-Dha exprimierten, die Spezifität ihrer Interaktion mit Sec63- C_{UB} -RUra3p (Abb 3.22).

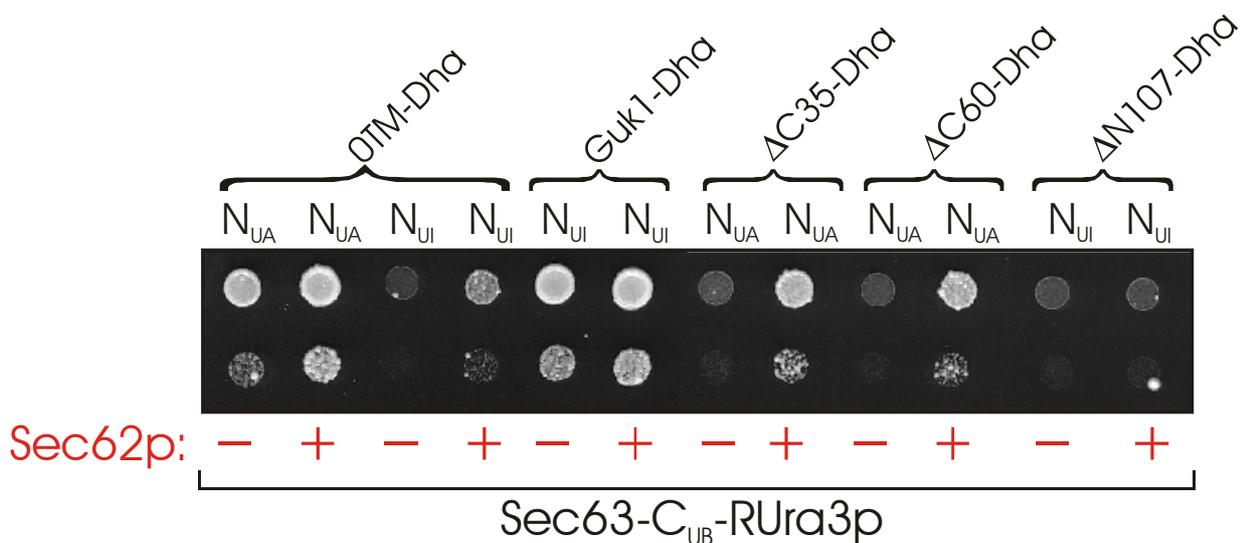


Abb 3.22: Die Interaktion der N_{UB} -modifizierten, carboxyterminalen Deletionsmutanten mit dem Sec-Komplex sind spezifisch.

Die unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors stehenden N_{UB} -Fusionen der Sec62p-Deletionsproteine und N_{UI} -Guk1p wurden im Hefestamm C63R-5 51 exprimiert. Zusätzlich enthielten die Zellen das Plasmid pRS314 (-) oder P_{GALI} *SEC62-pRS314* (+). Nach Anzucht in Uracil- und Galaktose-haltigem Medium wurden die Transformanten auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausplattiert und für 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Bemerkenswerterweise konnte auch für N_{UI} - und N_{UA} -0TM-Dha exprimierende Zellen durch die Überexpression von Sec62p eine deutliche Verbesserung des Wachstums erzielt werden. Nur für N_{UI} - $\Delta N107$ -Dha war keine Änderung der Wachstumsfähigkeit der Zellen zu verzeichnen. Die Wechselwirkung zwischen N_{UI} - $\Delta N107$ -Dha und Sec63- C_{UB} -RUra3p scheint somit auf eine unspezifische Nähe dieser beiden Proteine, ihre gemeinsame Lokalisation in der ER-Membran, zurückzuführen sein.

Die Expression der N_{UB} -Fusionsproteine wurde auf einem Westernblot überprüft (Abb 3.23). Die Expressionsniveaus der Proteine waren ungefähr gleich hoch und wurden nicht von der Überexpression des Sec62p beeinflusst. Nur N_{UI} -Guk1-Dha wurde stärker exprimiert als die anderen Fusionsproteine.

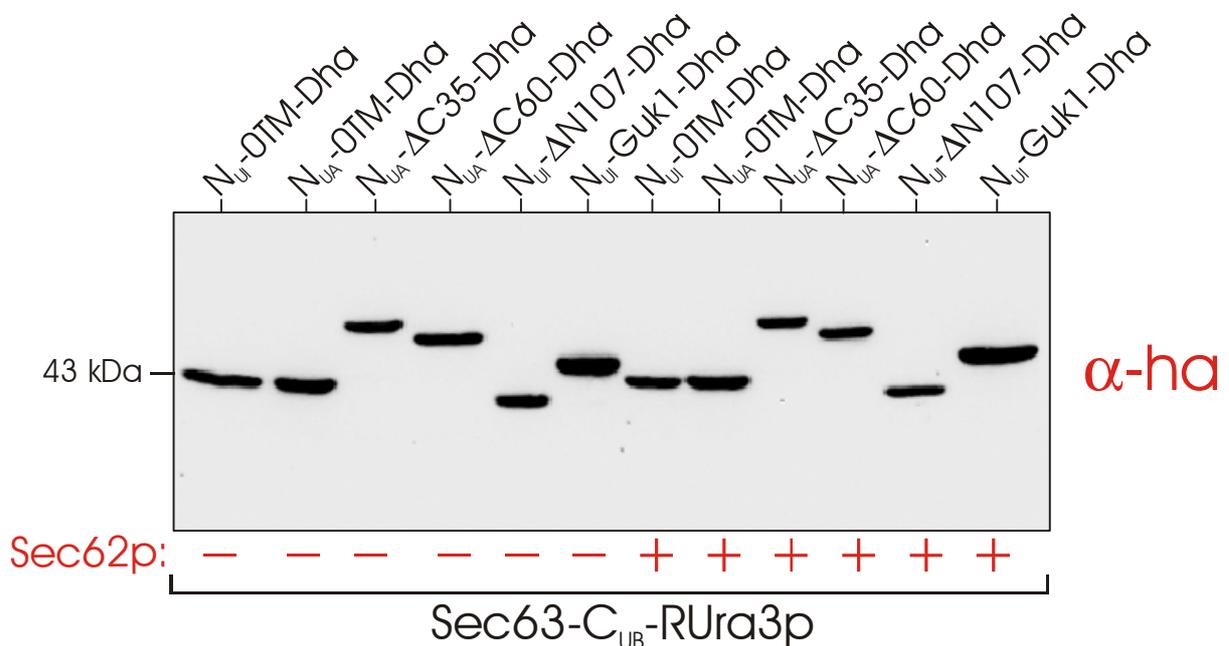


Abb 3.23: Expression der N_{UB} -modifizierten Deletionsproteine im Wettbewerb unter Galaktose-Bedingungen.

Zellen des Stammes C63R-5 51, die die angegebenen N_{UB} -Deletionsproteine unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors und zusätzlich unter dem P_{GALI} -Promotor Sec62p exprimierten (+) oder ein Leerplasmid enthielten (-), wurden in Galaktose-haltigem Ura⁺-Medium angezogen. Zusätzlich wurden Zellen kultiviert, die statt der Deletionsmutanten N_{UI} -Guk1-Dha exprimierten. Nach Herstellung von Gesamtproteinextrakten und deren Auftrennung durch SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-ha-Antikörpern behandelt.

Ich folgere aus dem direkten Split-Ub-Experiment, dass der intakte Sec62p-Aminoterminus notwendig und hinreichend ist, um an den Sec-Komplex binden zu können. Dieses Ergebnis belegt, dass der cytosolische N-terminale Bereich des Sec62p (0TM-Dha) direkt mit dem membrangebundenen Sec-Komplex interagiert.

3.3.5 Das *sec62-1*-Protein bindet deutlich schwächer an den Sec-Komplex

Deshaies und Schekman wiesen 1990 in ihrer Publikation darauf hin, dass bestimmte Deletionsmutanten des Sec62p das Wachstum des Stammes RSY529 (*sec62-1*) bereits bei der permissiven Temperatur inhibieren. Der Hefestamm RSY529 besitzt einen temperatursensitiven Defekt im *SEC62*-Gen. Dieser äußert sich in einem verlangsamten Wachstum der Zellen bei 30°C und der Unfähigkeit der Zellen, bei Temperaturen über 34°C zu wachsen. Der Wachstumsdefekt der Zellen bei erhöhten Temperaturen ist wahrscheinlich auf den schnellen Abbau des *sec62-1p* unter diesen Bedingungen zurückzuführen (Deshaies und Schekman, 1990). Um den Einfluss der von mir konstruierten *SEC62*-Deletionskonstrukte in diesem Stamm zu untersuchen, wurden die Sec62p-Deletionsmutanten in RSY529 exprimiert und das Wachstumsverhalten der Zellen bei verschiedenen Temperaturen analysiert (Abb 3.24). Zellen, die nur einen leeren Vektor enthielten dienten als Wachstumskontrolle.

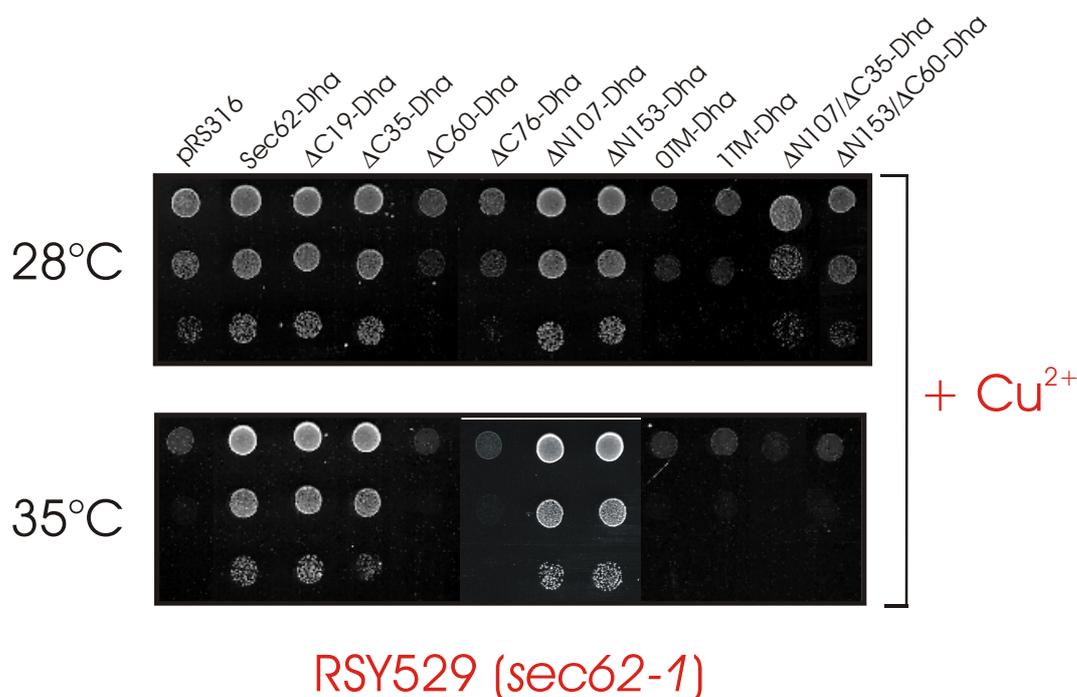


Abb 3.24: Dominant negativer Effekt einiger Sec62p-Deletionsproteine in RSY529 (*sec62-1*).

Die vom P_{CUP1} -Promotor kontrollierten, angegebenen Sec62p-Deletionsmutanten wurden in dem temperatursensitiven Hefestamm RSY529 (*sec62-1*) exprimiert. Als Referenz wurden ebenfalls Zellen dieses Stammes analysiert, die nur das Leerplasmid pRS316 trugen. Die Transformanten wurden in selektivem Medium angezogen und 10^5 , 10^4 und 10^3 Hefezellen wurden auf CuSO_4 -haltige SD-Platten aufgetropft. Die Platten wurden zwei (28°C) bzw. drei (35°C) Tage inkubiert.

Die Durchführung dieses Experimentes bei 35°C reproduziert die aus Abschnitt 3.3.1 (Plasmid-Shuffling) gewonnenen Daten. Neben Sec62-Dha konnten die C-terminalen Deletionsmutanten $\Delta\text{C19-Dha}$ und $\Delta\text{C35-Dha}$ sowie beide N-terminalen Mutanten $\Delta\text{N107-Dha}$ und $\Delta\text{N153-Dha}$

den temperatursensitiven Defekt des RSY529-Stammes bei den restriktiven Temperaturen (35°C, siehe Abb 3.24; 37°C, nicht gezeigt) komplementieren. Wie auch im Plasmid-Shuffling-Experiment führte ein erhöhtes Expressionsniveau des $\Delta C35$ -Dha durch CuSO_4 -Induktion zu einem verbesserten Wachstum der Zellen. Alle anderen Deletionsmutanten konnten den Defekt des *sec62-1*-Allels bei 35°C nicht kompensieren. Bei den permissiven Temperaturen wuchsen alle Transformanten gut auf CuSO_4 -freien Nährplatten (nicht gezeigt). Wurde die Expression der Deletionsmutanten durch Zugabe von 150 μM CuSO_4 zu den Platten gesteigert, so zeigten einige Transformanten tatsächlich einen negativ dominanten Effekt in den RSY529-Hefen (25°C, nicht gezeigt; 28°C, siehe Abb 3.24). Alle Deletionsproteine, die diesen toxischen Einfluss auf das Wachstum der *sec62-1*-Zellen hatten, sind nicht funktionell und besitzen einen intakten N-Terminus ($\Delta C60$ -Dha, $\Delta C76$ -Dha, 1TM-Dha und 0TM-Dha). Während z. B. die Überexpression von $\Delta C60$ -Dha das Wachstum der Hefen stark inhibierte, behinderte $\Delta N153/\Delta C60$ -Dha, dem zusätzlich die ersten 153 Aminosäuren des N-Terminus fehlen, das Wachstum der Zellen nicht. Es könnte sein, dass die überexprimierten, toxisch wirkenden Sec62-Deletionsmutanten das *sec62-1p* bei permissiven Temperaturen aus dem Sec-Komplex verdrängen und so durch eine nicht funktionelle Kopie ersetzen. Voraussetzung für die starke Ausprägung des dominant negativen Einflusses auf das Zellwachstum ist eine verminderte Bindungsfähigkeit des *sec62-1p* an den Komplex oder eine stark reduzierte zelluläre Konzentration dieses Proteins. Möglicherweise konnte aus der Sequenz des *sec62-1*-Allels ein genauere Hinweis auf den Ort der Bindungsstelle für den Sec-Komplex gewonnen werden. Das *sec62-1*-Allel des Stammes RSY529 wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (durchgeführt von M. Dünwald). Die Sequenzierung enthüllte eine Punktmutation im ORF des *sec62-1*-Allels, die im Sec62p-Aminoterminus an Position 46 zu dem Aminosäure-Austausch Glycin gegen Aspartat führt. Ein Plasmid-Shuffling-Experiment im $\Delta sec62$ -Stamm bestätigte den temperatursensitiven Defekt des *sec62-1*-Dha-Fusionsproteins. Die Expression des *sec62-1*-Dha erlaubte den $\Delta sec62$ -F62-Zellen bei 25°C, das $P_{CUP1} FLAG-SEC62-pRS316$ zu verlieren. Die wenigen FOA-resistenten Kolonien, die sich bei 35°C bildeten, zeigten, dass bei höherer Temperatur dieses Ereignis sehr viel seltener stattfand (nicht gezeigt).

Die Bindungsfähigkeit des *sec62-1p* an den Sec-Komplex wurde erneut in einem Kompetitionsexperiment gemessen. Das *sec62-1*-Allel wurde zwischen den P_{GALI} -Promotor und die Sequenz des *DHA* kloniert. Das so erhaltene $P_{GALI} sec62-1-DHA$ -Konstrukt wurde in Zellen transformiert, die Sec63-CUB-RUra3p und N_{UG}-Sec62p exprimierten. Das Expressionsniveau des *sec62-1*-Dha wurde überprüft, indem ein Gesamtproteinextrakt der in Galaktose-haltigem Medium gewachsenen Zellen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit anti-ha-Antikörpern behandelt wurde. Zum

Vergleich wurden auch Zellen analysiert, die anstelle des *sec62-1-Dha* das *wt-Sec62-Dha* unter der Kontrolle des P_{GALI} -Promotors exprimierten. Das Expressionsniveau des *wt-Sec62-Dha* überstieg dasjenige des *sec62-1-Dha* um ein Vielfaches. Deshalb wurde für die Konkurrenz anstatt des $P_{GALI} SEC62-DHA$, das Konstrukt $P_{MET25} SEC62-DHA$ eingesetzt. Der P_{MET25} -Promotor ist durch die Methionin-Konzentration im Medium regulierbar. Je höher die Methionin-Konzentration im Medium ist, desto geringer ist die Expression des durch diesen Promotor regulierten Gens. Durch Vergleich der Expressionsniveaus auf einem Westernblot (Abb 3.25) wurde die Methionin-Konzentration ermittelt, bei der *Sec62-Dha* und *sec62-1-Dha* ungefähr gleich stark exprimiert wurden (35 μ M Methionin).

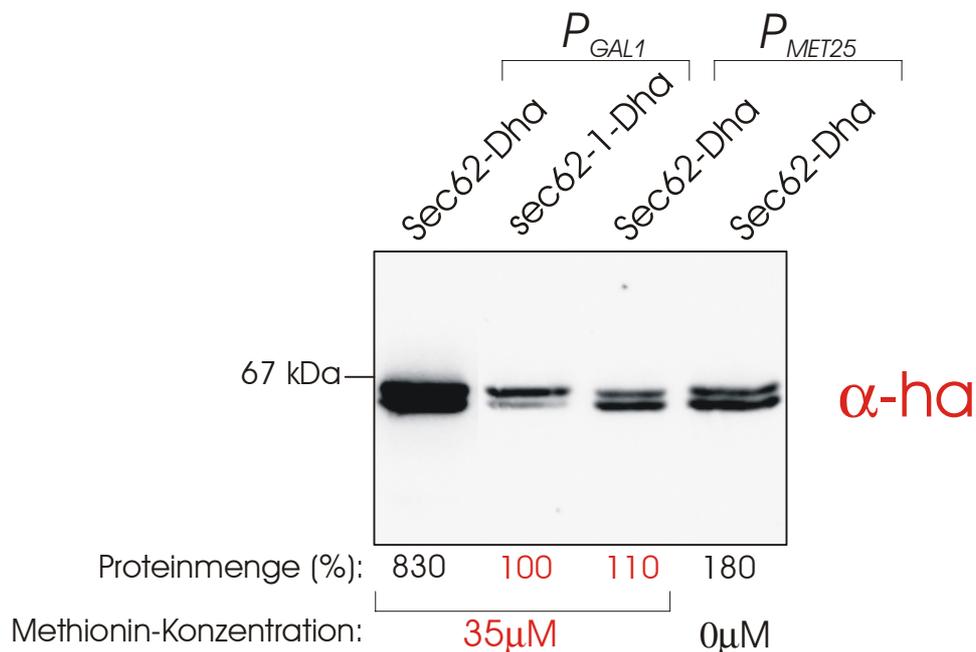
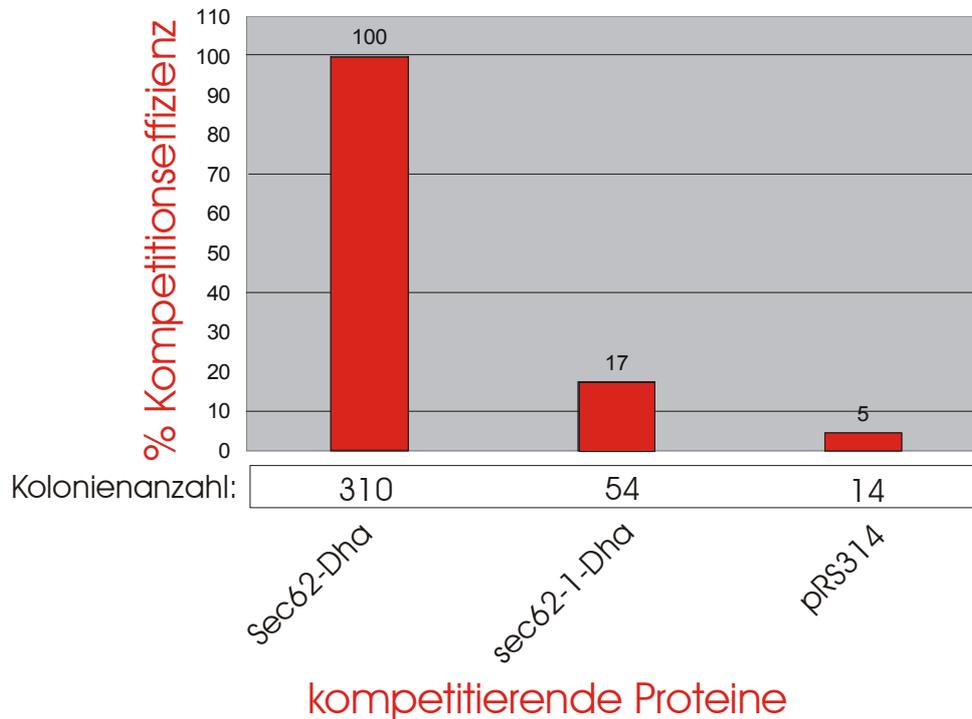


Abb 3.25: Ermittlung der für die Konkurrenz verwendbaren Methionin-Konzentration zum Abgleich der Expressionsniveaus von *Sec62-Dha* und *sec62-1-Dha*.

$P_{GALI} SEC62-DHA$, $P_{GALI} sec62-1-DHA$ bzw. $P_{MET25} SEC62-DHA$ wurden in C63R-5 51-Zellen transformiert, die ebenfalls N_{UG} -*Sec62p* exprimierten. Die Transformanten wurden bei 25°C in selektivem Galaktose-haltigem Medium kultiviert, welches 35 μ M oder 0 μ M Methionin enthielt. Die gewonnenen Gesamtproteinextrakte aus den Hefen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Dha-modifizierten Proteine mit anti-ha-Antikörpern nachgewiesen.

Unter diesen Bedingungen wurde anschließend das Konkurrenzexperiment durchgeführt. Die Hefen, die *Sec63-C_{UB}-RUra3p*, N_{UG} -*Sec62p* und unter dem P_{MET25} -Promotor *Sec62-Dha* bzw. unter dem P_{GALI} -Promotor *sec62-1-Dha* exprimierten, wurden in Galaktose-haltigem Medium, dem 35 μ M Methionin zugesetzt wurde, bei 25°C angezogen. Außerdem wurden Zellen analysiert, die statt der *Sec62p*-Konstrukte ein Leerplasmid enthielten. 10^4 Zellen der Transformanten wurden auf Galaktose-haltige Platten mit 35 μ M Methionin ausplattiert und die nach einer Woche bei 25°C gewachsenen Kolonien gezählt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Auszäh-

lungen sind in Diagr. 2 dargestellt. Der für Sec62-Dha ermittelte Wert wurde willkürlich auf 100 gesetzt.



Diagr. 2: Konkurrenzeffizienz des sec62-1-Dha.

Etwa 10^4 Zellen der $P_{CUP1} N_{UG}-SEC62$ -pRS313 enthaltenden, angegebenen C63R-5 51-Transformanten wurden auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten, die 35 μ M Methionin enthielten, ausgestrichen. Sec62-Dha wurde vom P_{MET25} -Promotor, sec62-1-Dha vom P_{GALI} -Promotor aus exprimiert. Die Anzahl der nach sieben Tagen bei 25°C gewachsenen Kolonien wurde gezählt und ist aufgeführt. Die Werte mitteln sich aus drei unabhängigen Auszählungen. Der für Sec62-Dha erhaltene Wert wurde willkürlich auf 100% Konkurrenzeffizienz gesetzt. Die jeweiligen Konkurrenzeffizienzen sind an den Balken aufgeführt.

sec62-1-Dha verdrängt N_{UG} -Sec62p sehr viel weniger effizient aus dem Sec-Komplex als das wt-Sec62-Dha. Seine Konkurrenzeffizienz ist etwa 1/6 so groß wie die des wt-Sec62-Dha. Dieser Effekt zeigt sich bereits bei der permissiven Temperatur. Somit führt der Aminosäure-Austausch an Position 46 im N-Terminus des Proteins zu einer verminderten Bindungsfähigkeit an den heptameren Sec-Komplex.

3.3.6 Der Aminoterminus des Sec62p bindet an die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p

Die mit der Split-Ub-Methode gefundene Bindung des Sec62p-Aminoterminus an den Sec-Komplex sollte mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Da das Split-Ub-System eine relativ neue Technik zur Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen ist, wurde die klassische Methode der Koimmunpräzipitation angewendet. Ein gegen das Protein von Interesse gerichteter

Antikörper bindet in Lösung an das Protein und präzipitiert es. Bildet dieses Protein mit weiteren Proteinkomponenten einen Komplex, so werden seine Bindungspartner kopräzipitiert.

Mit Hilfe dieser Methode wurde versucht, die Bindung des cytosolischen N-Terminus des Sec62p, 0TM-Dha, an Sec63p nachzuweisen. Es wurde jedoch nicht das gesamte Sec63p für dieses Experiment eingesetzt, sondern dessen C-terminaler, cytosolischer Bereich (63_{CT}). Er umfasst mit 419 Aminosäuren den größten Teil des aus 663 Aminosäuren bestehenden Sec63-Proteins. Ich wählte für diesen Versuch den Carboxyterminus des Sec63p aus, weil er cytosolisch und stark negativ geladen ist (Feldheim *et al.*, 1992) und deshalb die Bindungsstelle im Sec63p für das basische und ebenfalls cytosolische 0TM-Dha darstellen könnte. Durch Fusion des Flag-Epitops an seinen Aminoterminus wurde 63_{CT} immunologisch nachweisbar. *FLAG-63_{CT}* wurde hinter den induzierbaren *P_{GALI}*-Promotor kloniert. In JD53-Zellen wurden das vom *P_{CUPI}*-Promotor aus gesteuerte 0TM-Dha und Flag-63_{CT} koexprimiert. Als Referenz wurde statt 0TM-Dha das cytosolische Guk1-ha, das nicht an 63_{CT} binden sollte, eingesetzt. Um die Proteine in ausreichenden Mengen zu synthetisieren, wurden die Zellen in CuSO₄-haltigem Galaktosemedium angezogen. Die durch detergenzfreie Extraktion erhaltenen Gesamtproteinextrakte wurden mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen inkubiert. Über Nacht konnte die Bindung der ha-modifizierten Proteine 0TM-Dha bzw. Guk1-ha an die Antikörper erfolgen. Die gebundenen Proteine wurden schließlich präzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Westernblot mit anti-Flag-Antikörpern behandelt. Das an die anti-ha-Antikörper-Perlen gebundene 0TM-Dha konnte Flag-63_{CT} kopräzipitieren (Abb 3.26 A). Das präzipitierte Guk1-ha war erwartungsgemäß nicht in der Lage, Flag-63_{CT} zu binden. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, unternahm ich den umgekehrten Koimmunpräzipitationsansatz. Diesmal wurde Flag-63_{CT} durch anti-Flag-Antikörper präzipitiert und versucht, 0TM-Dha bzw. Guk1-ha auf dem Westernblot nachzuweisen. Wie Abb 3.26 B belegt, konnte ich auch durch diesen Versuchsansatz die Bindung zwischen 63_{CT} und dem Sec62p-Aminoterminus nachweisen.

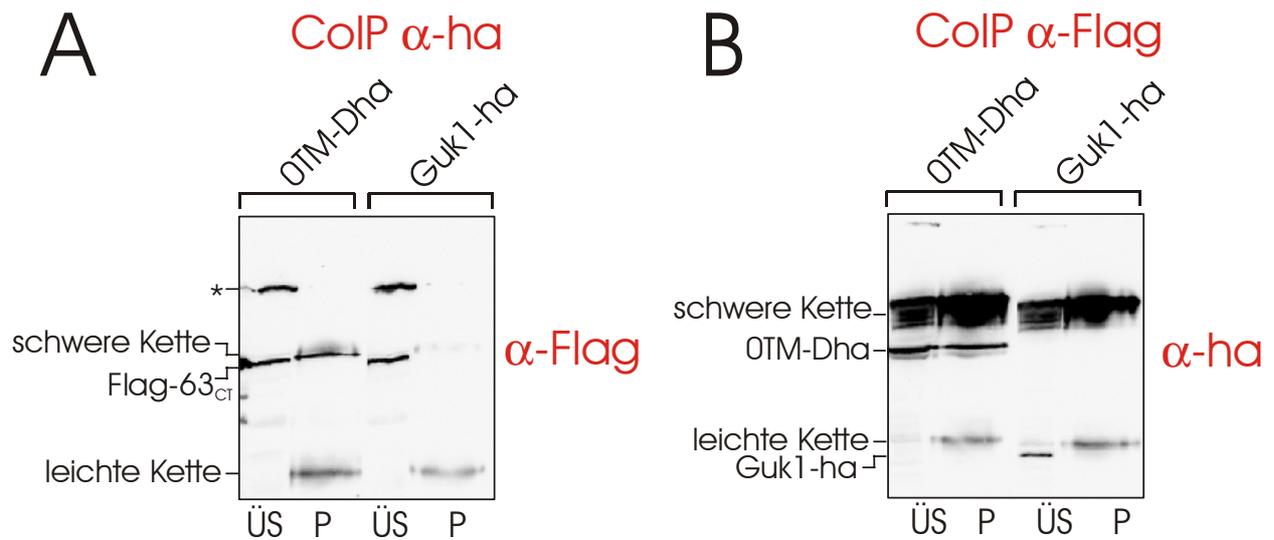


Abb 3.26: Der cytosolische C-Terminus des Sec63p bindet an den cytosolischen N-Terminus des Sec62p.

Flag-63_{CT} wurde vom *P_{GALI}*-Promotor aus gemeinsam mit OTM-Dha oder Guk1-ha, die beide unter der Kontrolle des *P_{CUP1}*-Promotors standen, in JD53-Zellen in CuSO₄-haltigem Galaktosemedium exprimiert. **(A)** Gesamtproteinextrakte der Hefezellen wurden mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen ü/N inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-Flag-Antikörpern behandelt, um Flag-63_{CT} nachzuweisen. **(B)** Zu Gesamtproteinextrakten der Hefezellen wurde anti-Flag-Antikörper gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die an den ersten Antikörper bindenden ProteinA-Agaroseperlen zugegeben und die Proteine ü/N weiter inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-ha-Antikörpern behandelt, um OTM-Dha bzw. Guk1-ha nachzuweisen.

CoIP: Koimmunpräzipitation; ÜS: Überstand der Koimmunpräzipitation; P: Präzipitat der Koimmunpräzipitation; *: Kreuzreaktion des anti-Flag-Antikörpers.

Um den Bereich im Sec63-Protein, der für die Bindung an die aminoterminal Domäne des Sec62p verantwortlich ist, enger einzugrenzen, wurden die Koimmunpräzipitationsexperimente mit verkürzten Varianten des 63_{CT} wiederholt. In 63_{CT}ΔC14 wurden carboxyterminal 14 Aminosäuren deletiert, 63_{CT}ΔC47 wurde um die C-terminalen 47 Aminosäuren verkürzt. Die deletierten Bereiche umfassen den Großteil der sauren Aminosäuren des stark negativ geladenen Sec63p-Carboxyterminus. *P_{CUP1} FLAG-63_{CT}ΔC14* und *P_{CUP1} FLAG-63_{CT}ΔC47* wurden gemeinsam mit OTM-DHA oder mit dem leeren Plasmid pRS315 in JD53 transformiert. Als positive Kontrolle wurden ebenfalls Zellen analysiert, die das intakte 63_{CT} zusammen mit OTM-Dha oder einem Leerplasmid exprimierten. Erneut wurden Proteinextrakte hergestellt und das OTM-Dha mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen präzipitiert. Auf dem mit anti-Flag-Antikörpern getesteten Westernblot ist nur für die Koexpression von OTM-Dha und dem intakten 63_{CT} eine Koimmunpräzipitationsbande erkennbar (Abb 3.27 A). Die 63_{CT}-Deletionsmutanten sind also nicht mehr in der Lage, OTM-Dha zu binden. Das macht das carboxyterminale 14 Aminosäuren lange Peptid des 63_{CT} zu einem guten Kandidaten für die Sec62p-Bindungsdomäne. Das umgekehrte Koimmunpräzipitationsexperiment konnte dieses Ergebnis reproduzieren (Abb 3.27 B).

Der direkte Beweis für die Bindung von 0TM-Dha an die letzten 47 bzw. 14 Aminosäuren des Sec63p sollte in dem anschließenden Experiment erbracht werden.

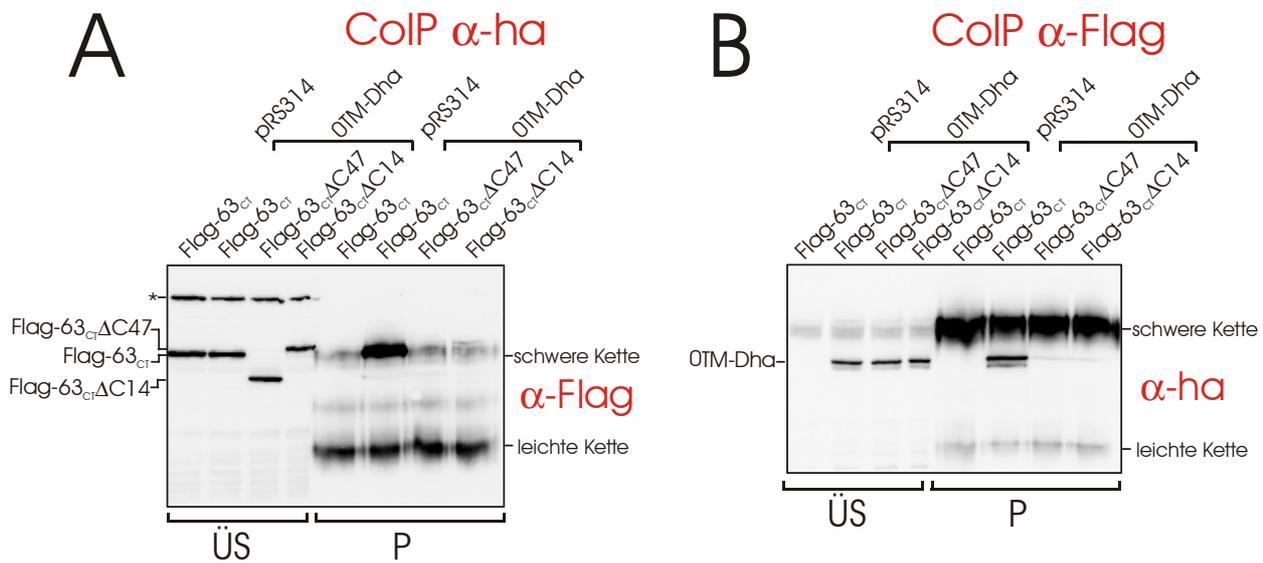


Abb 3.27: Die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p-Carboxyterminus sind für die Bindung an den cytosolischen N-Terminus des Sec62p essentiell.

Flag-63_{CT}, Flag-63_{CT} Δ C47 oder Flag-63_{CT} Δ C14 wurden vom P_{CUP1} -Promotor aus gemeinsam mit 0TM-Dha, das ebenfalls unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors stand, in JD53-Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurde statt 0TM-DHA ein Leerplasmid in die Zellen transformiert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von CuSO₄ zum Kulturmedium induziert. **(A)** Gesamtproteinextrakte der Hefezellen wurden mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen ü/N inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-Flag-Antikörpern behandelt, um Flag-63_{CT}, Flag-63_{CT} Δ C47 oder Flag-63_{CT} Δ C14 nachzuweisen. **(B)** Zu Gesamtproteinextrakten der Hefezellen wurde anti-Flag-Antikörper gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die an den ersten Antikörper bindenden ProteinA-Agaroseperlen zugegeben und die Proteine ü/N weiter inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-ha-Antikörpern behandelt, um 0TM-Dha nachzuweisen.

CoIP: Koimmunpräzipitation; ÜS: Überstand der Koimmunpräzipitation; P: Präzipitat der Koimmunpräzipitation; *: Kreuzreaktion des anti-Flag-Antikörpers.

Die letzten 14 bzw. 47 Aminosäuren des Sec63p-Carboxyterminus wurden an den C-Terminus des cytosolischen Fpr1p, eines FK506-bindenden Proteins ohne Bezug zur Translokation, fusioniert (Fpr1-63C14 bzw. Fpr1-63C47). Diese beiden Fpr1p/Sec63p-Chimären sollten, wenn ihre von Sec63p stammenden C-Termini an den N-Terminus des Sec62p binden können, gemeinsam mit 0TM-Dha präzipitierbar sein. Flag-Fpr1-63C14 bzw. Flag-Fpr1-63C47 wurden zusammen mit 0TM-Dha oder als Referenz mit N_{UI}-Guk1-Dha in JD53-Zellen koexprimiert. Die Expression aller Konstrukte stand unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors und wurde durch Cu²⁺-Ionen induziert. Gesamtproteinextrakte der Transformanten wurden entweder mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen oder mit anti-Flag-Antikörper kombiniert mit ProteinA-Agarose ü/N inkubiert. Anschließend wurden die an die Antikörper gebundenen Proteine auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-Flag- bzw. anti-ha-Antikörpern nachgewiesen (Abb 3.28). Das

präzipitierte 0TM-Dha konnte sowohl Flag-Fpr1-63C14 als auch Flag-Fpr1-63C47 mitpräzipitieren (Abb 3.28 A). Ein wahrscheinlich durch Proteolyse am C-Terminus verkürztes Flag-Fpr1-63C14 (siehe Abb 3.28 A, im ÜS mit * markiert) hatte wahrscheinlich einige, wenn nicht alle Aminosäuren des 63_{CT} eingebüßt und konnte nicht mehr kopräzipitiert werden (siehe Abb 3.28 A, P). Wurde die Koimmunpräzipitation mit anti-Flag-Antikörpern durchgeführt, so wurde 0TM-Dha, nicht aber N_{UI}-Guk1-Dha von beiden modifizierten Fpr1-Proteinen kopräzipitiert (Abb 3.28 B). Dieses Experiment beweist, dass der saure C-Terminus des Sec63p direkt an den basischen N-Terminus des Sec62p binden kann. Hierzu sind die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p hinreichend.

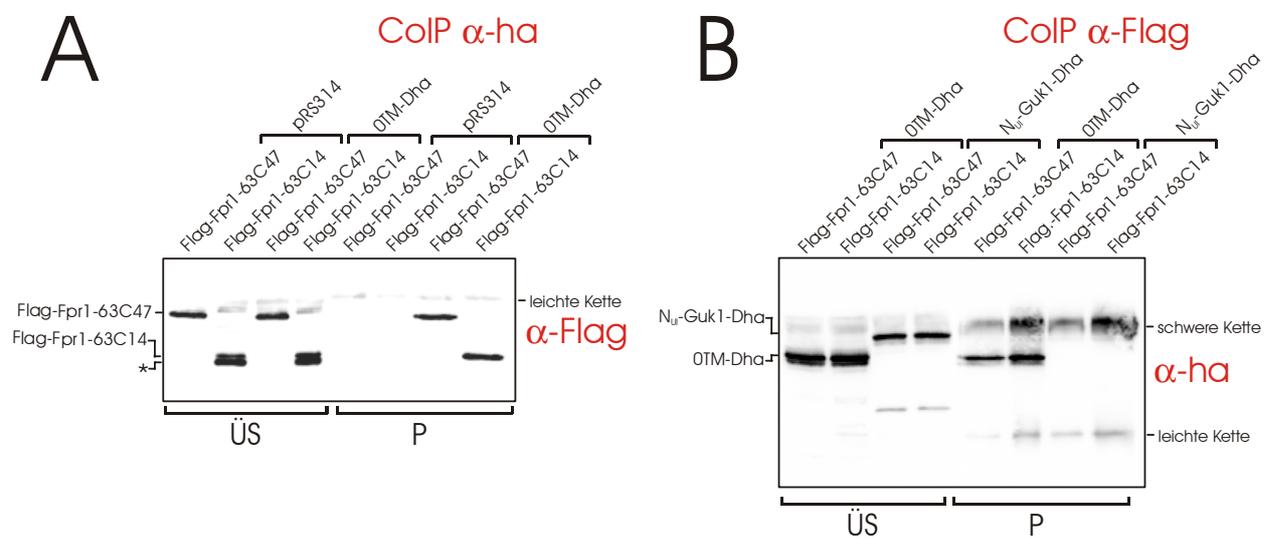


Abb 3.28: Die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p-Carboxyterminus binden an den cytosolischen Aminoterminus des Sec62p.

Flag-Fpr1-63C47 bzw. Flag-Fpr1-63C14 wurden vom P_{CUP1} -Promotor aus gemeinsam mit 0TM-Dha, das ebenfalls unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors stand, in JD53-Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurde statt 0TM-DHA ein Leerplasmid (A) oder N_{UI}-GUK1-DHA (B) in die Zellen transformiert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von CuSO₄ zum Kulturmedium induziert. (A) Gesamtproteinextrakte der Hefezellen wurden mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen ü/N inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-Flag-Antikörpern behandelt, um Flag-Fpr1p-63C47 oder Flag-Fpr1p-63C14 nachzuweisen. (B) Zu Gesamtproteinextrakten der Hefezellen wurden anti-Flag-Antikörper gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die an den ersten Antikörper bindenden ProteinA-Agaroseperlen zugegeben und die Proteine ü/N weiter inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-ha-Antikörpern behandelt, um 0TM-Dha bzw. N_{UI}-Guk1-Dha nachzuweisen.

CoIP: Koimmunpräzipitation; ÜS: Überstand der Koimmunpräzipitation; P: Präzipitat der Koimmunpräzipitation; *: Proteolytisches Abbauprodukt des Flag-Fpr1p-63C14, welches nicht mehr koimmunpräzipitiert werden kann.

3.3.7 Keiner der cytosolischen Termini des Sec62p ist hinreichend für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex

Ich konnte bisher zeigen, dass Sec62p hauptsächlich mit seiner N-terminalen Domäne an den heptameren Sec-Komplex bindet. Um festzustellen, ob diese Domäne auch verantwortlich für die Bindung an den trimeren Sec61-Komplex ist, wurden mit angereicherten Zellmembranen Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Sec62-Dha und die Deletionsmutanten Δ C35-Dha, Δ C60-Dha, Δ N107-Dha und 0TM-Dha wurden in JD53-Zellen exprimiert und ihre Expressionsniveaus kontrolliert. Da Δ C35-Dha ohne Cu^{2+} -Induktion sehr schwach und Δ N107-Dha etwas schwächer als die übrigen Sec62-Proteine exprimiert wurden, mussten die Proteinmengen angeglichen werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass zu den Hefekulturen, die für die Membranpräparation verwendet wurden, für eine Stunde (Sec62-Dha, Δ C60-Dha, Δ N107-Dha) oder für die Gesamtwachstumsdauer (Δ C35-Dha) CuSO_4 zugesetzt wurde. Nach der Präparation wurden die angereicherten Mikrosomenfraktionen einer Saponin- und Digitoninextraktion unterzogen. Saponin ist ein Detergenz, welches die luminalen und die peripher mit den Membranen assoziierten Proteine aus der Fraktion entfernt. Durch die darauffolgende Digitoninextraktion werden Membranproteine aus der Membran gelöst und bleiben bei der anschließenden Zentrifugation im Überstand, der als Digitoninextrakt bezeichnet wird. Die Behandlung der Mikrosomen mit diesen beiden Detergenzien erreicht die starke Anreicherung von Membranproteinen im Digitoninextrakt. Mit den aus den verschiedenen Transformanten erhaltenen Digitoninextrakten wurden die Koimmunpräzipitationsversuche unternommen. Zu den Digitoninextrakten wurden anti-ha-Antikörper gekoppelte Agaroseperlen zugegeben. Die Ansätze wurden ü/N inkubiert, um den Antikörpern die Möglichkeit zu geben, an die Dha-modifizierte Sec62-Proteine zu binden. Das Koimmunpräzipitat wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot mit anti-Sec61p-Antikörpern behandelt. Sec61p sollte mit allen Sec62p-Deletionsmutanten, die in der Lage sind, an den trimeren Sec61p-Komplex zu binden, kopräzipitiert werden.

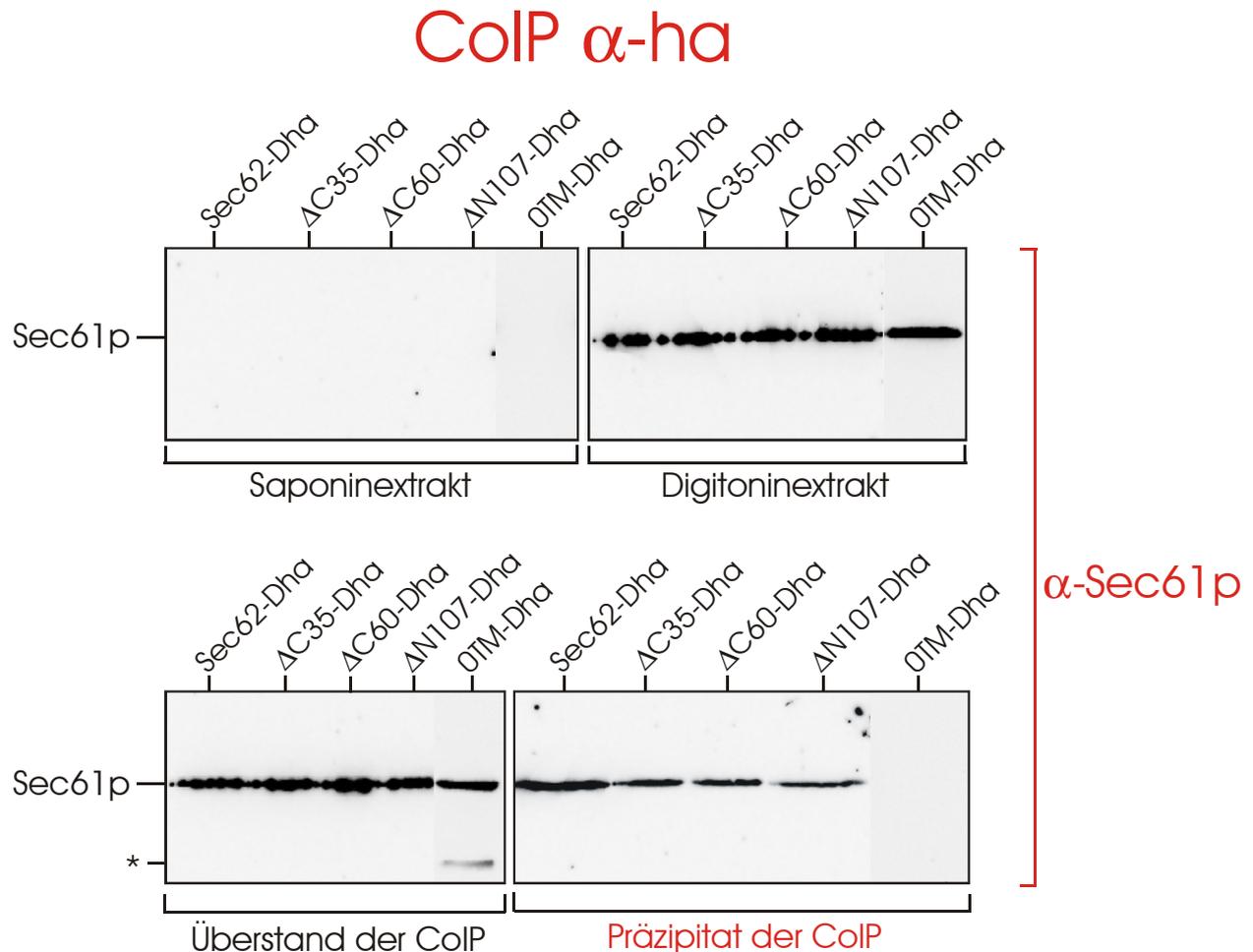


Abb 3.29: Koimmunpräzipitation von Sec62p-Deletionsmutanten mit Sec61p in JD53

Von JD53-Zellen, die entweder Sec62-Dha, Δ C35-Dha, Δ C60-Dha, Δ N107-Dha oder 0TM-Dha unter der Kontrolle des *P_{CUP1}*-Promotors exprimierten, wurden Mikrosomen präpariert. Die Membranen wurden einer differentiellen Extraktion mit Saponin- und anschließend mit Digitonin-haltigem Puffer unterzogen. Die erhaltenen Digitoninextrakte wurden mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen ü/N inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-Sec61p-Antikörpern behandelt, um Sec61p nachzuweisen. CoIP: Koimmunpräzipitation. *: proteolytisches Abbauprodukt von Sec61p.

Alle Mutanten außer 0TM-Dha konnten Sec61p kopräzipitieren (Abb 3.29). Die stärkste Bindung an den trimeren Komplex zeigte wt-Sec62p-Dha, für alle Deletionsmutanten wurde die Bindung deutlich schwächer. Δ C35-Dha, Δ C60-Dha und Δ N107-Dha erreichten alle ca. 30% des Koimmunpräzipitationsvermögens von Sec62-Dha. Für Zellen, die 0TM-Dha exprimierten war kein Sec61p auf dem Westernblot nachweisbar. Um den Einfluss des nativen Sec62p auf dieses Koimmunpräzipitationsexperiment abschätzen zu können, führte ich den Versuch ebenfalls in Δ sec62-Zellen durch. Natürlich konnte der Test nur mit Δ sec62-Zellen gemacht werden, in denen funktionelle Sec62p-Deletionsmutanten die Aufgabe des Sec62p übernehmen konnten. Es wurden die Stämme Δ sec62-Sec62-Dha, Δ sec62- Δ C35-Dha und Δ sec62- Δ N107-Dha verwendet. Das mit diesen Zellen erhaltene Ergebnis der Koimmunpräzipitation wich nicht von dem der

JD53-Zellen ab (Abb 3.30). Sec62-Dha konnte Sec61p am besten präzipitieren, für die Mutanten wurde eine ähnlich schwache Koimmunpräzipitationsrate wie in Wildtyp-Zellen erreicht. In $\Delta sec62$ -Hefen, die kein ha-modifiziertes Protein exprimierten (Negativkontrolle), präzipitierten die anti-ha-Antikörper Sec61p erwartungsgemäß nicht mit.

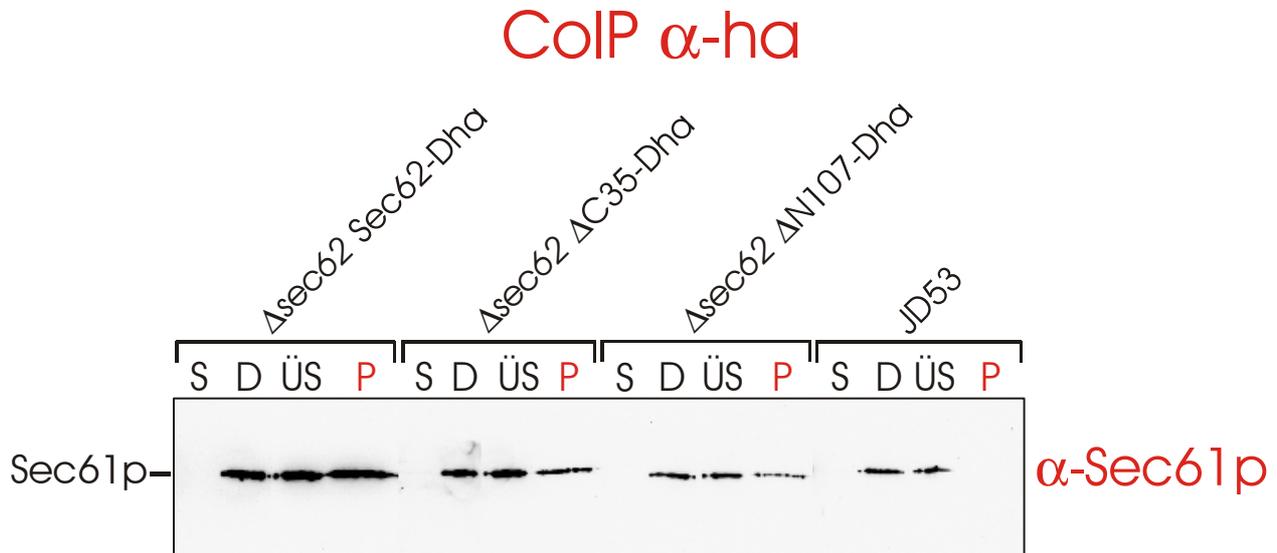


Abb 3.30: Koimmunpräzipitation von Sec62p-Deletionsmutanten mit Sec61p im $\Delta sec62$ -Stamm.

Von $\Delta sec62$ -Zellen, die entweder Sec62-Dha, $\Delta C35$ -Dha oder $\Delta N107$ -Dha unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors exprimierten sowie von JD53-Zellen wurden Mikrosomen präpariert. Die Membranen wurden einer differentiellen Extraktion mit Saponin- und anschließend mit Digitonin-haltigem Puffer unterzogen. Die erhaltenen Digitoninextrakte wurden mit anti-ha-Antikörper gekoppelten Agaroseperlen ü/N inkubiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine in einer SDS-PAGE wurde der Immunblot mit anti-Sec61p-Antikörpern behandelt, um Sec61p nachzuweisen.

CoIP: Koimmunpräzipitation; S: Saponinextrakt; D: Digitoninextrakt; ÜS: Überstand der Koimmunpräzipitation; P: Präzipitat der Koimmunpräzipitation.

Keiner der einzeln deletierten Bereiche des Sec62p scheint somit für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex absolut essentiell zu sein. Die Interaktion des Sec62p mit diesem Komplex findet deshalb möglicherweise in einer beide Transmembranregionen umfassenden Domäne zwischen den Aminosäuren 108 und 248 statt.

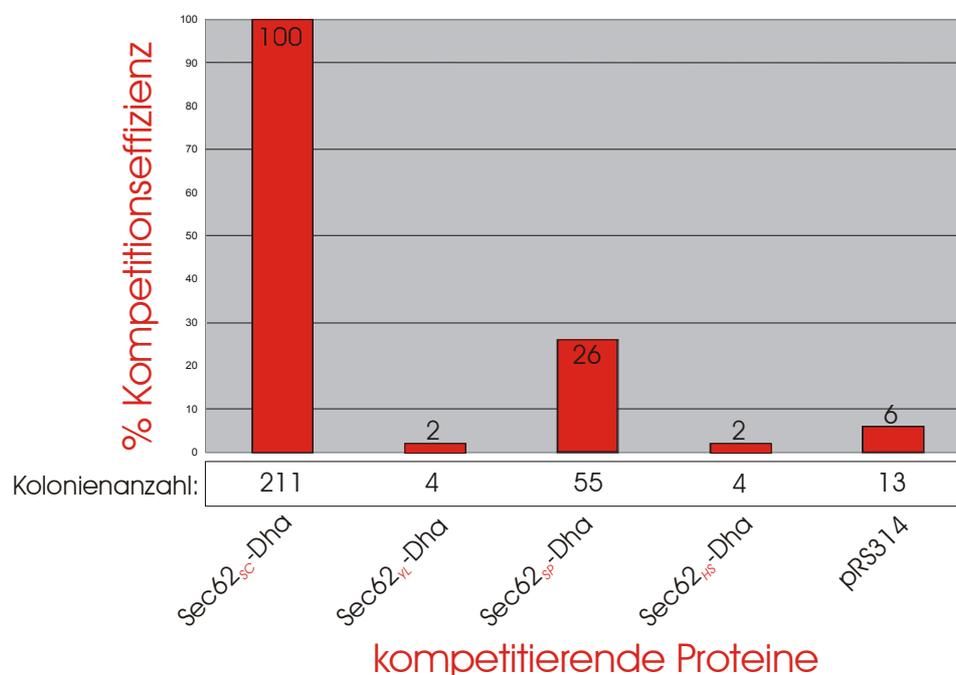
3.4 Analyse von Sec62-Proteinen aus anderen Spezies

Während der letzten Jahre wurden Proteine in anderen Spezies entdeckt, die starke Sequenzhomologie zu Sec62p aus *S. cerevisiae* aufweisen. Das Sec62p-Homologe aus *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) konnte in einem $\Delta sec62$ -Stamm die Funktion des Sec62p der Hefe *S. cerevisiae* vollständig übernehmen. Es ist ein 396 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Swennen *et al.*, 1997). Die cDNA des Sec62p-Homologen aus *Homo sapiens* (*H. sapiens*) wurde 1997 von Daimon *et al.* publiziert. Das ORF kodiert ein Protein von 399 Aminosäuren, von dem kürzlich nachgewiesen wurde, dass es sich mit dem trimeren Sec-Komplex und dem Sec63p-Homologen aus *H. sapiens* in einem immunpräzipitierbaren Komplex befindet (Meyer *et al.*, 2000). Auch die DNA- und Aminosäure-Sequenz eines homologen Sec62-Proteins aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) wurde bereits identifiziert (DDBJ/GenBankTM/EBI Datenbank, Zugangsnummer Z99162). Eine Charakterisierung dieses Proteins wurde bisher nicht beschrieben. In Abb 3.31 ist ein Sequenzvergleich der homologen Sec62-Proteine aus *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *S. pombe* und *H. sapiens* dargestellt. Alle Sec62-Proteine besitzen sehr wahrscheinlich zwei Transmembrandomänen. Die Regionen, die die Transmembrandomänen flankieren sowie die kurze, luminaire Proteinregion weisen hohe Sequenzverwandtschaft auf. Auch Teile des Sec62p-Aminoterminus zeigen zwischen den vier Spezies eine gute Konservierung (vergleiche die Sequenz ab Aminosäureposition 30 bis 70 im Sec62p-Aminoterminus von *S. cerevisiae*). Die Aminosäuresequenz des C-Terminus des Sec62p aus *S. cerevisiae* weicht am stärksten von den Sequenzen der übrigen Proteine ab. Der Carboxyterminus des Sec62p aus *S. cerevisiae* ist wesentlich kürzer als derjenige aller anderen Sec62-Proteine. Die C-Termini der Sec62p-Homologen aus *Y. lipolytica*, *S. pombe* und *H. sapiens* sind ähnlicher zueinander als zum *S. cerevisiae* Sec62p. Insgesamt beträgt die prozentuale Ähnlichkeit zwischen Sec62p aus *S. cerevisiae* und dem Sec62p-Homologen aus *Y. lipolytica* 34%, dem Sec62p-Homologen aus *S. pombe* 27% und dem Sec62p-Homologen aus *H. sapiens* 29%.

Ich klonierte die DNA-Sequenz der Sec62p-Homologen aus *Y. lipolytica* und *S. pombe* mit Hilfe von PCR auf genomische DNA der jeweiligen Hefe (Sec62_{YL} bzw. Sec62_{SP}). Aus einem humanen cDNA-Klon konnte durch PCR das ORF des Sec62p-Homologen aus *H. sapiens* gewonnen werden (Sec62_{HS}). Die Sequenzen dieser drei Sec62p homologen Proteine wurden um die Sequenz des DHA verlängert (Sec62_{YL}-Dha, Sec62_{SP}-Dha, Sec62_{HS}-Dha). Die jeweiligen Proteine konnten dadurch mit anti-ha-Antikörpern auf einem Immunblot detektiert werden. Um die Fähigkeit dieser Proteine, an den heptameren Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* zu binden, zu untersuchen, führte ich Konkurrenzexperimente durch. Anschließend überprüfte ich die Funktionalität der Sec62p-Homologen in dem *S. cerevisiae* Δ sec62-Stamm. Als Referenz wurde jeweils das Sec62-Dha aus *S. cerevisiae* eingesetzt, welches im Folgenden als Sec62_{SC}-Dha bezeichnet wird.

3.4.1 Konkurrenzeffizienz der Sec62p-Homologen aus anderen Spezies

Sec62_{SC}-Dha, Sec62_{YL}-Dha, Sec62_{SP}-Dha bzw. Sec62_{HS}-Dha wurden unter der Kontrolle des *P_{GALI}*-Promotors in *S. cerevisiae*-Hefezellen exprimiert, die zusätzlich Sec63-C_{UB}-Rura3p und N_{UG}-Sec62p exprimierten. Etwa 10⁴ Zellen der jeweiligen Transformanten wurden auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausgestrichen und die nach einer Woche Inkubationszeit bei 30°C gewachsenen Kolonien gezählt. Das Ergebnis von vier unabhängigen Auszählungsexperimenten ist in Diagr. 3 dargestellt.



Diagr. 3: Konkurrenzeffizienz der Sec62p homologen Proteine aus anderen Spezies.

Etwa 10⁴ Zellen der *P_{CUP1} N_{UG}-SEC62-pRS313* enthaltenden, angegebenen C63R-5 51-Transformanten wurden auf Galaktose-haltige Ura⁻-Platten ausgestrichen und die Anzahl der nach sieben Tagen bei 30°C gewachsenen Kolonien wurde gezählt. Die jeweilige Anzahl an Kolonien ist aufgeführt. Die gezeigten Werte mitteln sich aus vier unabhängigen Auszählungen. Der für Sec62_{SC}-Dha erhaltene Wert wurde willkürlich auf 100 gesetzt. Die relative Konkurrenzeffizienz der Sec62p homologen Proteine ist an den Balken angegeben.

Aus Diagr. 3 kann man entnehmen, dass neben Sec62_{SC}-Dha nur Sec62_{SP}-Dha in der Lage war, messbar an den Sec-Komplex zu binden. Die Konkurrenzeffizienz des Sec62_{SP}-Dha war im Vergleich zu der des Sec62_{SC}-Dha zwar auf ¼ reduziert, aber aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit als signifikant einzuschätzen. Das humane Sec62p-Homologe bindet in diesem Test nicht an den Sec-Komplex. Ein unerwartetes Ergebnis war die Unfähigkeit des Sec62_{YL}, an den Sec-Komplex zu binden, da Sec62_{YL} näher verwandt mit Sec62_{SC} ist als die beiden anderen Sec62p-Homologen. Durch die Analyse der Expressionsniveaus der Proteine konnte die wahrscheinliche Ursache festgestellt werden. Die Proteinmenge des Sec62_{YL}-Dha war im Vergleich zu derjenigen der übrigen Proteine, die mindestens ebenso gut wie Sec62_{SC}-Dha exprimiert wurden, sehr gering (nicht gezeigt). Aus diesem Grund kann über die Konkurrenzeffizienz des Sec62_{YL}-Dha keine Aussage gemacht werden.

3.4.2 Funktionalität der Sec62p homologen Proteine aus anderen Spezies

Die Funktionalität der homologen Sec62-Proteine aus *Y. lipolytica*, *S. pombe* und *H. sapiens* in der Bäckerhefe wurde durch das in Abschnitt 3.3.1.2 beschriebene Plasmid-Shuffle-Experiment im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 überprüft (Abb 3.32).

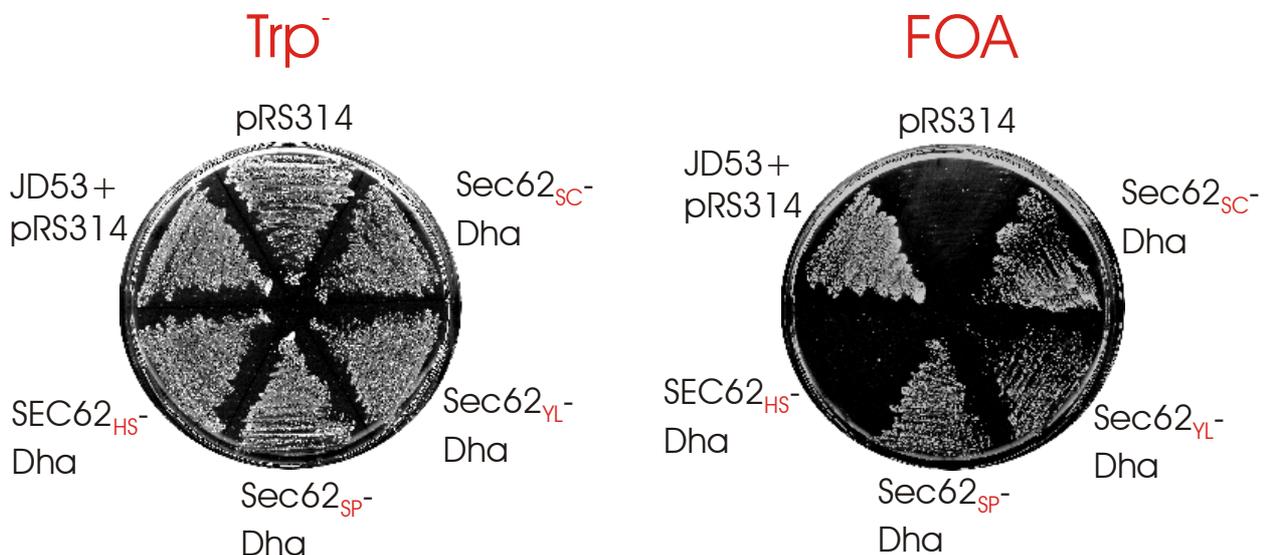


Abb 3.32: Funktionalitätstest der homologen Sec62-Proteine aus anderen Spezies (Plasmid-Shuffle-Experiment).

Die unter der Kontrolle des *P_{CUP1}*-Promotors stehenden Sec62p-Homologen wurden im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 exprimiert. Nach einer zweitägigen Inkubationszeit in Uracil-haltigem SD-Medium wurden 10^6 Zellen der Transformanten zur Wachstumskontrolle auf Trp⁻-Platten und auf FOA-haltige Nährplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 25°C inkubiert. FOA-Resistenz der Zellen weist auf die Expression eines funktionellen Sec62-Proteins hin.

Die Trp⁻-Kontrollplatte, die nur auf die Anwesenheit der Plasmide, die die einzelnen Sec62-Proteine exprimierten, selektiert, zeigt das gute Wachstum aller Transformanten. Das gute Wachstum der Sec62_{YL}-Dha und Sec62_{SP}-Dha exprimierenden Hefezellen auf FOA-haltigen Platten beweist, dass diese Proteine die essentielle Funktion des Sec62p aus *S. cerevisiae* übernehmen können. Für die mit Sec62_{HS}-Dha transformierten Zellen wuchsen nach fünf Tagen einige sehr kleine, auf Abb 3.32 nicht sichtbare Kolonien heran. Diese Zellen wurden bisher weder phänotypisch noch genotypisch analysiert. Es bleibt daher offen, ob und welche Bedeutung das Heranwachsen dieser Kolonien hat. Auf jeden Fall ist die Funktionalität des Sec62_{HS}-Dha im Vergleich zu der Funktionalität der beiden anderen homologen Sec62p in der Bäckerhefe stark eingeschränkt.

Die Expression von Sec62_{SC}-Dha, Sec62_{YL}-Dha, Sec62_{SP}-Dha und Sec62_{HS}-Dha im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 wurde durch einen Immunblot mit anti-ha-Antikörpern kontrolliert (Abb 3.33).

Ebenfalls überprüft wurde die Abwesenheit des Flag-Sec62p nach der Ausplattierung der Transformanten auf FOA-haltige Nährplatten (nicht gezeigt).

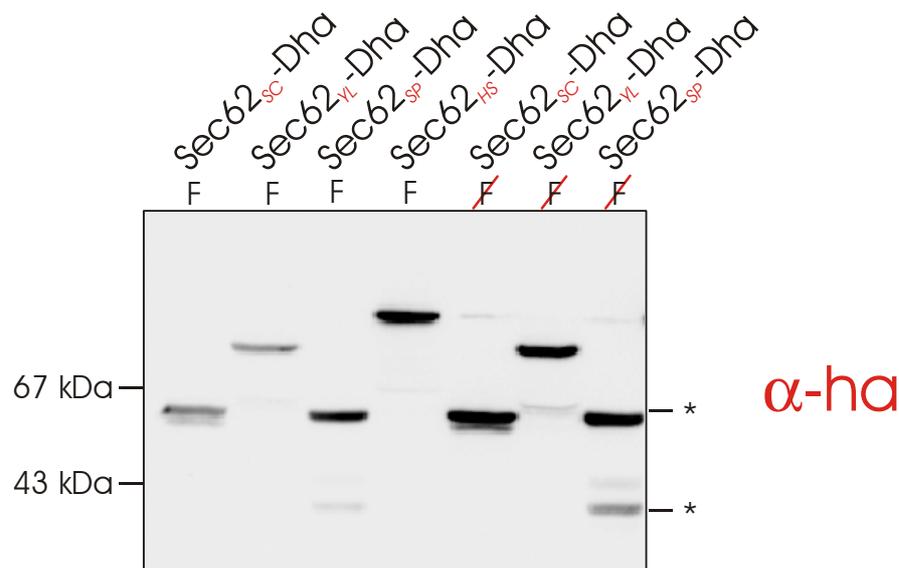


Abb 3.33: Expressionsniveaus der verschiedenen homologen Sec62-Proteine im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 vor und nach Plasmid-Shuffling.

Die unter der Kontrolle des P_{CUP1} -Promotors stehenden homologen Sec62-Proteine wurden im Hefestamm $\Delta sec62$ -F62 exprimiert. Es wurden von diesen Transformanten Gesamtproteinextrakte hergestellt, bevor sie auf FOA-haltige Platten ausgestrichen wurden, also das Flag-Sec62p exprimierende Plasmid noch in den Zellen vorhanden war (F). Die Proteine der Transformanten, die auf FOA-haltigen Platten wachsen konnten und somit kein *FLAG-SEC62* mehr enthielten (~~F~~) wurden ebenfalls extrahiert. Die Extrakte wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die homologen Sec62-Proteine mit anti-ha-Antikörpern nachgewiesen. *: proteolytische Abbauprodukte der Proteine.

Sowohl vor als auch nach der Ausplattierung der Transformanten auf FOA-haltige Nährplatten wurden alle funktionellen Sec62-Proteine gut exprimiert (Abb 3.33). Das Expressionsniveau von Sec62_{HS}-Dha konnte nur vor der Ausplattierung der Transformanten auf FOA-haltige Nährplatten analysiert werden (Abb 3.33). Nach dem Plasmid-Shuffling wurde das Expressionsniveau der Proteine offensichtlich noch erhöht. Für alle Sec62p-Homologen aus anderen Spezies sind deutlich Banden zu erkennen, die sehr wahrscheinlich proteolytische Abbauprodukte darstellen (Abb 3.33, mit * markiert).

Die in diesem Abschnitt der Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen, dass Sec62p-homologe Proteine aus *Y. lipolytica* und *S. pombe* in *S. cerevisiae*-Zellen funktionell sind und das Sec62p-Homologe aus *S. pombe* an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* binden kann. Dies dokumentiert den hohen Konservierungsgrad der Bindung zwischen Sec62-Proteinen und Komponenten des heptameren Sec-Komplexes. Das homologe menschliche Sec62p ist in der Bäckerhefe nicht funktionell und bindet auch nicht messbar an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae*.

4 Diskussion

Die meisten gängigen Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* oder *in vitro* sind für lösliche Proteine optimiert. So erlaubt die 1989 von Fields und Song entwickelte Dihybrid-Technik zwar die gezielte Suche nach Proteinbindungspartnern, erfordert jedoch die Rekonstitution der Bindung des Proteinpaares im Zellkern. Dadurch wird eine Aussage über die Interaktion dieser Proteine in ihrer natürlichen Umgebung meist unmöglich. Die Untersuchung von Membranproteinen und die Analyse ihrer Interaktionen gestaltet sich daher äußerst schwierig.

Johnsson und Varshavsky publizierten 1994 die Split-Ub-Technik, mit der sich prinzipiell die Wechselwirkungen von Proteinen *in vivo* an ihrem natürlichen Ort in der Zelle messen lassen. In dieser Arbeit habe ich die Voraussetzungen und die Bedingungen untersucht, unter denen sich dieses neue System für die Analyse der Interaktion von Membranproteinen eignet. Zuerst wurde mit der Split-Ub-Methode die räumliche Nähe zwischen Proteinkomponenten des ER-Translokationsapparates näher definiert und die molekulare Umgebung eines Translokonproteins, Sec63p, bestimmt. Ausgehend von diesen Untersuchungen setzte ich die Split-Ub-Methode ein, um das Protein Sec62p, eine Komponente des ER-Translokationsapparates, strukturell und funktionell zu charakterisieren. Insbesondere versuchte ich, die Domäne im Sec62-Protein zu bestimmen, die für die Bindung an den Sec-Komplex verantwortlich ist.

4.1 Die Interaktion der Translokonkomponenten Sec63p und Sec62p

Ich versuchte zunächst, die Anwendbarkeit des Split-Ub-Systems für die Untersuchung von Membranproteinen an ihrem natürlichen Aufenthaltsort in der Zelle zu zeigen. Für die Analyse der Membranprotein-Interaktionen wurde mit Sec63p eine Komponente des ER-Translokationsapparates ausgewählt. Sec63p bot sich für die beabsichtigten Studien an, da seine Lokalisation und Topologie bekannt waren und seine Funktion bei der posttranslationalen Translokation etabliert war (Rothblatt *et al.*, 1989; Deshaies *et al.*, 1991; Feldheim *et al.*, 1992; Brodsky und Schekman, 1993). Darüber hinaus war bekannt, dass Sec63p mit mehreren Proteinen einen Komplex eingeht. Gemeinsam mit Sec62p, Sec71p und Sec72p befindet es sich im tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex. Der tetramere Sec62p/Sec63p-Komplex bildet zusammen mit Sec61p, Sbh1p und Sss1p den heptameren Sec-Komplex (Deshaies *et al.*, 1991; Panzner *et al.*, 1995). Sec63p wurde mit C_{UB} und den Reporterproteinen Dha bzw. RUra3p verlängert. Als Partnerprotein für das modifizierte Sec63p wurde Sec62p, ebenfalls eine Proteinkomponente des tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplexes, ausgewählt. N_{UB} wurde an den N-Terminus von Sec62p

fusioniert. Die mit beiden Reporterproteinen gemessene, effiziente Ub-Reassoziatio n zwischen N_{UB} -Sec62p und Sec63- C_{UB} -RUra3p spiegelt die funktionell bedingte Nähe der beiden unmodifizierten Proteine wider. Bei Koexpression von Sec63- C_{UB} -Dha und N_{UB} -Sec62p führten die N_{UI} - und die N_{UA} -Versionen des Sec62p-Fusionsproteins zur völligen Abspaltung des Dha-Reporterproteins, N_{UG} -Sec62p bewirkte noch mehr als 50% Spaltung. Das nicht an der Translokation beteiligte ER-Membranprotein N_{UB} -Bos1p konnte nur als N_{UI} -Variante eine Spaltungsreaktion bewirken (Abb 3.3 A). Der physiologische Wachstumstest erbrachte ein noch klareres Ergebnis. Bei Expression von N_{UB} -Sec62p in C63R-5 51-Zellen wurde unabhängig von der Version des N_{UB} (N_{UI} , N_{UA} oder N_{UG}) das Reporterprotein so vollständig von Sec63- C_{UB} -RUra3p abgespalten und anschließend abgebaut, dass keiner Transformante das Wachstum auf Ura⁻Platten möglich war. Die Expression von N_{UB} -Bos1p in diesen Zellen bewirkte nur für die N_{UI} -Variante eine starke Wachstumsinhibition auf Uracil-freien Platten (Abb 3.3 B).

Bei dem Funktionalitätstest des C_{UB} -Reporterprotein modifizierten Sec63p stellte sich für die haploiden Zellen ein temperatursensitiver Wachstumsdefekt bei 37°C heraus. Das C_{UB} -Reporterprotein-Modul schränkt die Funktion von Sec63p also leicht ein. Während meiner Arbeit konnte ich keine Auswirkungen dieser funktionellen Einschränkung des Sec63p auf die Lokalisation des Proteins feststellen. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass eine für mich nicht messbare Fehllokalisierung des Sec63p durch die C_{UB} -Reporterprotein-Modifikation bewirkt wurde.

Die Reassoziatio n von N_{UB} und C_{UB} hängt von der lokalen Konzentration der an sie gekoppelten Proteine ab. Deshalb ist die Voraussetzung für die Schlussfolgerung einer engen Nachbarschaft von Sec63p und Sec62p eine für beide eingesetzten N_{UB} -Proteine ungefähr gleiche Proteinkonzentration in der Zelle. Da weder N_{UB} -Sec62p noch N_{UB} -Bos1p mit einem Epitop versehen wurden, konnten ihre Expressionsniveaus nicht über Westernblot bestimmt werden, sondern mussten durch den Einsatz eines weiteren C_{UB} -Reporterprotein modifizierten Proteins abgeschätzt werden. Das Fusionsprotein der cytosolischen Triosephosphatisomerase Tpi1p- C_{UB} -Dha zeigte bei Koexpression von N_{UB} -Sec62p bzw. N_{UB} -Bos1p ein für beide N_{UB} -Fusionsproteine vergleichbares Spaltungsmuster. Nur die N_{UI} -Varianten der Membranproteine führen zur Abspaltung des Dha-Reporterproteins (nicht gezeigt). Eine stringendere Kontrolle bildete die C_{UB} -RUra3p-Fusion des nicht an der Translokation beteiligten ER-Membranproteins Ste14p. Wurden Ste14- C_{UB} -RUra3p und N_{UB} -Sec62p bzw. N_{UB} -Bos1p gemeinsam in einer Zelle exprimiert, so war das Wachstumsmuster der beiden Transformanten nicht unterscheidbar (Abb 3.9). Die mit den C_{UB} -Fusionsproteinen Tpi1p und Ste14p erzielten Ergebnisse belegen eine in etwa gleiche zelluläre Konzentration der N_{UB} -modifizierten Proteine Sec62p und Bos1p. Darüber hinaus beweist die

etwa gleich starke Interaktion der N_{UB}-Fusionsproteine mit Ste14-C_{UB}-RUra3p, dass die zwischen N_{UB}-Sec62p und Sec63-C_{UB}-RUra3p gemessene, sehr starke Wechselwirkung nicht allein auf die Nähe dieser beiden Proteine während ihrer Einbettung in die ER-Membran beruhen kann. Wäre dies der Fall, so müsste auch Ste14p, das wie Sec63p ein polytopisches Membranprotein ist, eine größere Nähe zu Sec62p als zu Bos1p aufweisen.

Durch die vorgenommenen Kontrollen wird die Spezifität der gemessenen Nähe von Sec62p zu Sec63p erhärtet und die durch genetische und biochemische Untersuchungen bewiesene Sec62p-Sec63p-Interaktion (Deshaies et al., 1992) erstmals *in vivo* demonstriert.

Die mit dem Split-Ub-System erzielten Ergebnisse konnten allerdings nicht beweisen, dass die beiden Translokonproteine Sec63p und Sec62p in einem gemeinsamen Proteinkomplex gebunden sind. Der Nachweis dafür wurde in einem Konkurrenzexperiment erbracht. Wie ich in Abschnitt 3.1.2 zeigen konnte, erlaubt die Koexpression von Sec63-C_{UB}-RUra3p und N_{UG}-Sec62p kein Wachstum der Hefezellen auf Ura⁻-Platten. Wurden Sec62p oder Sec62-Dha in diesem Konkurrenzexperiment nun zusätzlich in diesen Zellen überexprimiert, so erlangten die Zellen die Fähigkeit, auf Ura⁻-Platten zu wachsen, zurück (Abb 3.6). Die für diesen Versuch eingesetzten Referenzproteine Ste14-Dha und Tpi1-ha wurden zwar in großem Überschuss in der Zelle synthetisiert (nicht gezeigt), bewirkten aber keine Uracil-Prototrophie der Transformanten. Nur die effektive Verdrängung des N_{UG}-Sec62p durch Sec62p bzw. Sec62-Dha kann somit das Wachstum der Hefezellen auf Uracil-freien Platten einfach erklären. Eine solche Verdrängung wiederum kann nur dann stattfinden, wenn N_{UG}-Sec62p und das konkurrierende Protein um dieselbe Bindungsstelle in einem Proteinkomplex konkurrieren. Aus diesem Grund schließe ich, dass sich Sec63p und Sec62p in einem gemeinsamen Proteinkomplex befinden müssen. Dies steht im Einklang mit den *in vitro* ausgeführten Experimenten von Deshaies *et al.* (1991), nach denen Sec63p und Sec62p gemeinsam präzipitiert werden können.

Die zusätzliche Auswertung der Konkurrenzergebnisse durch Auszählung der gewachsenen Kolonien der einzelnen Transformanten auf Galaktose-haltigen Ura⁻-Platten erlaubte eine semi-quantitative Beurteilung des Experimentes. Es zeigte sich hier, dass das mit Dha modifizierte Sec62p weniger stark an den Sec-Komplex binden konnte als das unmodifizierte Sec62p (Abschnitt 3.1.3). Der Wachstumstest hatte diese genaue Beobachtung nicht zugelassen. Der Einfluss des Dha-Moduls auf die Bindungsfähigkeit des Sec62p an den Sec62p/Sec63p-Komplex musste in den folgenden Experimenten stets (Abschnitt 3.3) berücksichtigt werden.

1998 veröffentlichten Stagliar *et al.* die Anwendung des Split-Ub-Systems auf die Untersuchung der ER-Membranproteine Wbp1p und Ost1p, zwei Proteinen des Oligosaccharyltransferase-Komplexes. Sie konnten mit einem Reportersystem, das sich von dem von mir ausgearbeiteten unterscheidet, eine Interaktion dieser beiden Proteine nachweisen. Beide Untersuchungen zeigen eindeutig, dass die Split-Ub-Methode zur Analyse der Interaktion von Membranproteinen geeignet ist.

4.2 Bestimmung des molekularen Umfeldes des ER-Membranproteins Sec63p *in vivo*

Im ersten Teil meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass das Split-Ub-System dazu geeignet ist, die Interaktionen von membrangebundenen Proteinen zu untersuchen. Mit dieser Methode sollte es daher möglich sein, das molekulare Umfeld von Sec63p noch umfassender zu charakterisieren. Hierzu wurden N_{UB}-Fusionen von 14 Proteinen bekannter Lokalisation verwendet. Bis auf die beiden cytosolischen Proteine Tpi1p und Guk1p wurden ausnahmslos Membranproteine gewählt, so dass Vertreter von verschiedenen Zellkompartimenten (ER, Golgi-Apparat, Endosom, Vakuole, Plasmamembran und Mitochondrium) in die Analyse einbezogen wurden. Da bei einem N_{UB}-Fusionsprotein der Abstand des N_{UB} von der Membran möglicherweise die N_{UB}-C_{UB}-Reassoziations-effizienz beeinflusst, wurden hauptsächlich Vertreter aus einer großen Proteinfamilie ausgewählt. Es wurden Vertreter der Syntaxin-Familie der v- und t-SNAREs herangezogen, die sich alle durch ein gemeinsames Strukturprinzip auszeichnen (Weimbs *et al.*, 1997). Alle Mitglieder dieser Superfamilie besitzen einen cytosolischen N-Terminus, eine einzige Transmembrandomäne und eine aus wenigen Aminosäuren bestehende C-terminale Domäne, die ins Lumen des jeweiligen Kompartimentes ragt. Da die N-Termini aller t- und v-SNAREs starke Homologie zueinander aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass das N_{UB} in allen diesen Proteinen einen ähnlichen Abstand und ähnliche Ausrichtung zur Membran hat.

Sec63-C_{UB}-RUra3p und die 14 N_{UB}-modifizierten Proteine wurden gemeinsam in C63R-5 51-Zellen exprimiert. Die verschiedenen N_{UB}-Fusionsproteine bewirkten abhängig von ihrem Aufenthaltsort in der Zelle ein spezifisches Wachstumsverhalten der Transformanten auf Ura-Platten. Dies wird nachfolgend abschnittsweise diskutiert.

4.2.1 Distanz zwischen Sec63p und ER-Membranproteinen

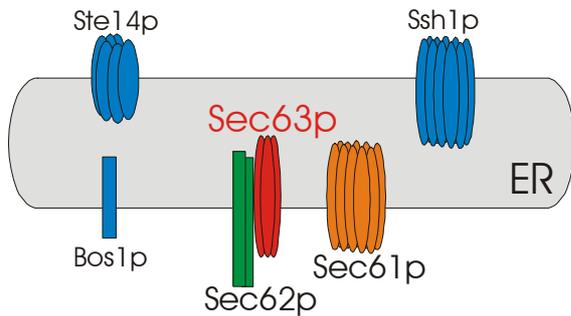


Abb 4.1: Schematische Darstellung der im Interaktionstest eingesetzten ER-Membranproteine.

Für den Interaktionstest auf Uracil-freien Platten wurde Sec63p als C_{UB} -Rura3p-Fusionsprotein exprimiert. Sec62p, Sec61p, Ssh1p, Bos1p und Ste14p wurden als N_{UB} -Fusionsproteine mit Sec63- C_{UB} -Rura3p koexprimiert und ihre Wechselwirkung analysiert.

Als Vertreter des ER wurden neben N_{UB} -Sec62p N_{UB} -Fusionen der Translokationskomponente Sec61p, des Sec61p-Homologen Ssh1p und der ER-Membranproteine Bos1p und Ste14p, die keine Funktion während der Translokation ausüben, für die Analyse verwendet (Abb 4.1). Der Interaktionstest konnte zwischen Sec63p-bindenden Proteinen und ER-Membranproteinen, die nicht an Sec63p binden, unterscheiden. Diese Unterscheidung wurde durch die N_{UA} -Versionen der ER-Proteine möglich. N_{UA} -Sec62p und N_{UA} -Sec61p erlaubten den Transformanten nicht, auf Uracil-freien Platten zu wachsen. Alle anderen eingesetzten N_{UA} -Fusionsproteine behinderten das Wachstum der Hefen kaum (siehe Abb 3.7).

Die N_{UG} -Varianten von Sec62p und Sec61p gestatteten eine weitere Differenzierung zwischen beiden Proteinen. Während N_{UG} -Sec62p das Wachstum der Hefen völlig inhibierte, erlaubte N_{UG} -Sec61p den Transformanten ein schwaches Wachstum auf Uracil-freien Platten (siehe Abb 3.7). Der unterschiedliche Effekt dieser beiden Translokationskomponenten könnte durch ein leicht höheres Expressionsniveau des N_{UB} -Sec62p bewirkt werden. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass der Abstand zwischen N_{UB} und der ER-Membran bei beiden Proteinen unterschiedlich ist. Bei N_{UB} -Sec62p könnte das N_{UB} möglicherweise besser für die Reassoziierung mit C_{UB} und/oder die Ubps zugänglich sein, so dass eine leicht höhere Spaltungsrate auftritt. Die stärkere Wechselwirkung von Sec63- C_{UB} -Rura3p mit N_{UB} -Sec62p ist aber auch dadurch erklärbar, dass Sec62p einen sehr stabilen Komplex mit Sec63p bildet, Sec61p aber an diesen Sec62p/Sec63p-Komplex weniger stark zu binden scheint. Diese Interpretation wird durch Immunpräzipitationsdaten unterstützt. Auch hierbei bindet Sec62p stabiler an Sec63p als an Sec61p (Deshaies *et al.*, 1991).

Sehr viel eindeutiger fiel die Unterscheidung zwischen Sec61p und Ssh1p aus. Ssh1p weist eine sehr viel größere Distanz zu Sec63p auf als Sec61p. Das Sec61p-Homologe Ssh1p verhält sich im Interaktionstest so wie die übrigen, nicht am Translokationsprozess beteiligten ER-Membranproteine Ste14p und Bos1p. Nur die N_{UI} -Versionen dieser Proteine verhindern das

Wachstum der Zellen auf Ura⁻-Platten, die N_{UA}- und N_{UG}-Fusionen behindern das Zellwachstum nicht (siehe Abb 3.7). Das erst kürzlich entdeckte Ssh1p (Finke *et al.*, 1996) könnte, bedingt durch seine starke Homologie zu Sec61p, eine alternative Translokationspore in der ER-Membran bilden. Bisher wurde seine Beteiligung an der Translokation von Proteinen jedoch noch nicht nachgewiesen. Auch eine Koimmunpräzipitation mit Komponenten des heptameren Sec-Komplexes, bis auf Sss1p, dem Proteinpartner, den es mit Sec61p teilt, wurde nicht erreicht. Die von mir gemessene, verglichen mit Sec61p größere Distanz von Ssh1p zu Sec63p, ist ein starker Hinweis darauf, dass Ssh1p auch nicht *in vivo* mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex assoziiert. Seine Teilnahme an der posttranslationalen Translokation wird dadurch sehr unwahrscheinlich.

Ste14p wurde als Referenz für den Inhibitionstest der C63R-5 51-Zellen eingesetzt. Ste14p ist wie Sec63p ein polytopisches ER-Membranprotein und wird aller Wahrscheinlichkeit nach ebenso durch den Translokationsapparat in die ER-Membran integriert. Alle N_{UB}-modifizierten ER-Membranproteine verhielten sich im physiologischen Wachstumstest auf Uracil-freien Platten gegenüber Ste14-C_{UB}-RUra3p identisch (siehe Abb 3.9). Dies schließt einerseits eine starke Überexpression eines der N_{UB}-Fusionsproteine aus. Andererseits beweist es die Spezifität der gegen Sec63-C_{UB}-RUra3p gemessenen Distanzen von Sec62p und Sec61p, die nicht allein auf ihre Nähe zu Sec63p während des Translokationsprozesses zurückzuführen ist.

4.2.2 Distanz zwischen Sec63p und Sed5p

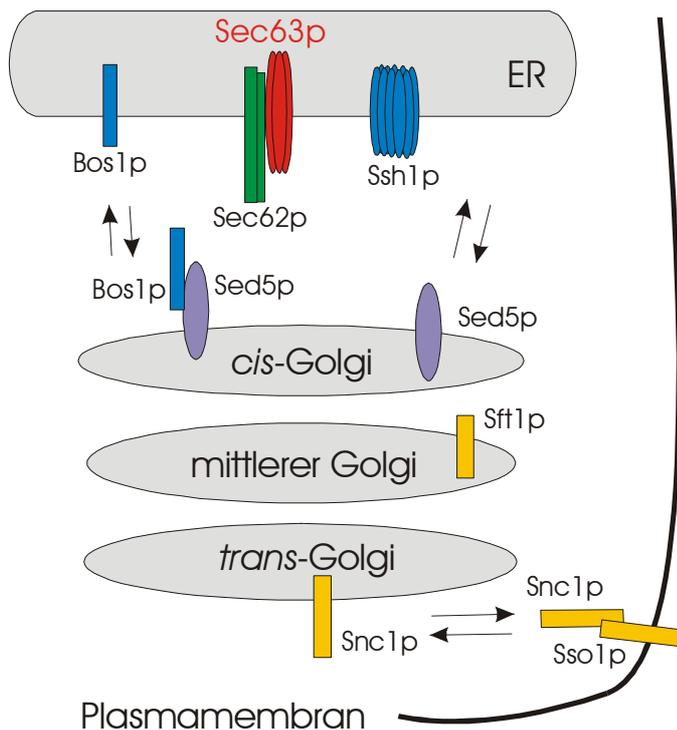


Abb 4.2: Schematische Darstellung der Lokalisation der im Interaktionstest eingesetzten N_{VI}-Fusionsproteine.

Für den Interaktionstest auf Uracil-freien Platten wurde Sec63p als C_{UB}-RUra3p-Fusionsprotein exprimiert. Sec62p, Ssh1p, Bos1p, Sed5p, Sft1p, Snc1p und Sso1p wurden als N_{VI}-Fusionsproteine mit Sec63-C_{UB}-RUra3p koexprimiert. Die Wechselwirkung der modifizierten Proteine wurde im Wachstumstest analysiert.

Die Abgrenzung des *cis*-Golgi-Proteins N_{UB}-Sed5p von den N_{UB}-Fusionen der ER-Membranproteine Ste14p und Bos1p war mit Hilfe der drei N_{UB}-Varianten N_{UI}, N_{UA} und N_{UG} nicht eindeutig. Im Wachstumstest auf Uracil-freien Platten war das Wachstumsmuster der jeweiligen C63R-5 51-Transformanten kaum unterscheidbar (siehe Abb 3.7). Ich versuchte deshalb, durch die Verwendung der neuen N_{UB}-Mutante N_{VI} eine höhere Auflösung des Split-Ub-Tests zu erhalten. Die Affinität des N_{VI} zu C_{UB} liegt zwischen der des N_{UI} und des N_{UA}. Durch Wachstumsvergleich von C63R-5 51-Zellen, die N_{VI}-Varianten von Proteinen verschiedener Lokalisation exprimierten (Abb 4.2), konnte Sed5p eindeutig von den ER-Membranproteinen abgegrenzt werden. Während alle N_{VI}-Fusionen der ER-Proteine zur Inhibition des Zellwachstums führten, erlaubten alle N_{VI}-Fusionen der eingesetzten Golgi-Proteine (Sft1p: mittleres Golgi, Snc1p: spätes Golgi/Plasmamembran) das vollständige Wachstum der C63R-5 51-Zellen (siehe Abb 3.8). Da auch N_{VI}-Sed5p das uneingeschränkte Wachstum der Hefen zuließ, konnte ich es in die Reihe der Golgi-Proteine einordnen. Warum war der Einsatz der N_{VI}-Variante des N_{UB} erforderlich, um Sed5p von den ER-Proteinen absondern zu können? Kürzlich wurde gezeigt, dass Sed5p über das ER zyklisch zurück zum *cis*-Golgi-Apparat transportiert wird (Wooding und Pelham, 1998). Während seines Kreislaufs hat Sed5p die Gelegenheit, in die Nähe von Sec63p zu gelangen. Vielleicht ist sogar ein geringer Prozentsatz der Sed5p-Population stets im ER zu finden. Dies könnte eine häufigere Spaltungsreaktion im Split-Ub-Test bewirken und macht die Notwendigkeit des Einsatzes der spezifischeren N_{VI}-Version zur Unterscheidung von den ER-Membranproteinen erklärbar.

4.2.3 Einsatz von weiteren C_{UB}-Rura3p-modifizierten Proteinen

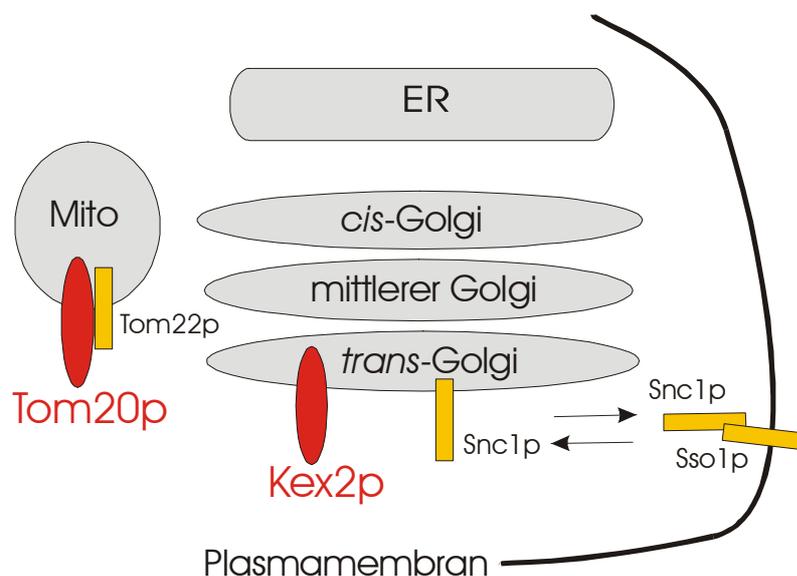


Abb 4.3: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation der im Interaktionstest mit Tom20-C_{UB}-Rura3p bzw. Kex2-C_{UB}-Rura3p charakterisierten N_{UB}-Fusionsproteine.

Für den Interaktionstest auf Uracil-freien Platten wurden Tom20p bzw. Kex2p als C_{UB}-Rura3p-Fusionsproteine exprimiert. Die Lokalisation von Tom22p, Snc1p und Sso1p, die als N_{UB}-Fusionsproteine koexprimiert wurden, konnte genauer definiert werden, als mit Sec63-C_{UB}-Rura3p als Markerprotein.

Die Unterscheidung zwischen dem späten Golgi-/Plasmamembranprotein Snc1p, dem Plasmamembranprotein Sso1p und Tom22p, einem mitochondrialen Membranprotein, war im Wachstumstest mit C63R-5 51-Zellen nicht möglich. Die N_{UI} -Versionen aller drei Proteine schränkten das Wachstum der C63R-5 51-Zellen leicht ein (siehe Abb 3.7). Offensichtlich nimmt die Auflösungskraft dieser Methode bei zunehmender Distanz der N_{UB} -Proteine zu dem C_{UB} -Fusionsprotein zu stark ab. Warum zeigen N_{UB} -Fusionsproteine, die im Mitochondrium, im späten Golgi-Apparat oder in der Plasmamembran lokalisiert sind, überhaupt eine Interaktion mit Sec63- C_{UB} -RUra3p? Ich vermute, dass für Snc1p und Sso1p der Kontakt mit Sec63p während der Einbettung ihrer Transmembrandomänen in die ER-Membran erfolgt. Da dieser Prozess eine gewisse Aufenthaltsdauer im ER erfordert, könnte ausreichend Zeit für die N_{UB} - C_{UB} -Reassoziaton gegeben sein. N_{UI} -Pep12p und N_{UI} -Vam3p zeigen diese Interaktion jedoch nicht, obwohl diese beiden Proteine ebenfalls vor dem Transport zu ihrer Ziellokalisation in die ER-Membran inseriert werden müssen. Möglicherweise liegt in der Zelle eine höhere Proteinkonzentration der N_{UB} -Fusionsproteine von Snc1p bzw. Sso1p als von Pep12p bzw. Vam3p vor. Für die erstaunliche Tatsache, dass ein Protein der Mitochondrienmembran eine messbare Nähe zum ER zeigt, können zwei Gründe aufgeführt werden. Der wahrscheinlichste ist eine partielle Misslokalisierung des Tom22p in die ER-Membran. Es kann sich dabei jedoch nur um einen geringen Teil der Tom22p-Population handeln, da eine ausgeprägtere Fehllokalisierung ins ER ein stärkeres, mit den ER-Membranproteinen vergleichbares Signal im Split-Ub-Test erfordern würde. Die zweite Erklärungsmöglichkeit folgt aus der Beobachtung, dass ER und Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen oft benachbart sind. Ob dies die Ursache für die gemessene Interaktion zwischen Sec63- C_{UB} -RUra3p und N_{UB} -Tom22p sein könnte, bleibt im Rahmen dieser Arbeit offen.

Um der Limitierung mit Sec63p als einzigem C_{UB} -RUra3p-Fusionsprotein entgegenzutreten, mussten zusätzliche C_{UB} -RUra3p-Markerproteine, die nicht in der ER-Membran verankert sind, eingesetzt werden (Abb 4.3). Zur Unterscheidung zwischen Tom22p auf der einen Seite und Snc1p und Sso1p auf der anderen Seite wurde Tom20- C_{UB} -RUra3p verwendet. Tom22p konnte im Interaktionstest mit Tom20- C_{UB} -RUra3p als mitochondriales Protein charakterisiert und eindeutig von Snc1p und Sso1p abgegrenzt werden. Das modifizierte Tom20p zeigte nur mit N_{UB} -Tom22p und mit keinem der anderen getesteten N_{UB} -Fusionsproteine eine sichtbare Interaktion im Wachstumstest (siehe Abb 3.10). Der Interaktionstest verifiziert die bereits beschriebene, enge Nachbarschaft von Tom20p und Tom22p (Schatz, 1997) zum ersten Mal *in vivo*.

Die Unterscheidung zwischen dem *trans*-Golgi/Plasmamembranprotein Snc1p und dem Plasmamembranprotein Sso1p gelang durch den Einsatz des *trans*-Golgi Markerproteins Kex2- C_{UB} -

RUra3p. Die N_{UA} -Versionen von Snc1p und Sso1p schränken im Gegensatz zu allen anderen getesteten N_{UA} -Fusionsproteinen das Wachstum der CK2R-5 53-Zellen auf Ura⁻-Platten ein (siehe Abb 3.12). Eine größere Distanz von Sso1p als von Snc1p zu Kex2p konnte jedoch erst auf FOA-haltigen Platten unzweifelhaft belegt werden. N_{UA} -Snc1p ermöglichte als einziges Fusionsprotein bei Koexpression mit Kex2- C_{UB} -RUra3p den Transformanten das vollständige Wachstum auf FOA-haltigen Nährplatten (siehe Abb 3.13).

Das Wachstum der CK2R-5 53-Zellen auf Ura⁻-Platten wurde durch die Expression von N_{UA} -Pep12p, einem endosomalen t-SNARE-Protein, nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis war unerwartet, da wahrscheinlich alle residenten Membranproteine des späten Golgi-Apparates während ihrer Lebensdauer vom *trans*-Golgi-Kompartiment in die Endosomenmembran transportiert werden und von dort aus wieder zurück zum späten Golgi gelangen (Franzoso *et al.*, 1991; Cereghino *et al.*, 1995). Ich hätte deshalb erwartet, dass der Aufenthalt von Kex2p im Endosom mit dem Interaktionstest gemessen werden kann. Am naheliegendsten ist, dass N_{UB} -Pep12p in einer zu geringen Konzentration in der Zelle vorliegt, um effizient mit Kex2- C_{UB} -RUra3p wechselwirken zu können. Allerdings ist das Expressionsniveau des N_{UB} -Pep12p hoch genug, um den temperatursensitiven Wachstumsdefekt eines *Δpep12*-Stammes komplementieren zu können (nicht gezeigt). Möglicherweise ist jedoch die Zeit, die Kex2p in der Endosomenmembran verbringt, zu kurz, um die Reassoziaton von N_{UB} und C_{UB} bewirken zu können. Vielleicht findet der Kreislauf des Kex2p in Subkompartimenten der Endosomenmembran statt, die für Pep12p nicht zugänglich sind. Es sind Anhaltspunkte für die Existenz eines frühen und eines späten endosomalen Kompartimentes vorhanden (Holthuis *et al.*, 1998). Während sich der Kreislauf von Kex2p auf das frühe Endosom beschränken könnte, könnte Pep12p im späten Endosom lokalisiert sein, so dass die beiden Proteine nie aufeinander treffen. Eventuell werden aber die Hinweise, die auf einen Kreislauf des Kex2p zwischen *trans*-Golgi und endosomalem Kompartiment hindeuten, falsch interpretiert. Ein direkter Beweis für den Kreislauf der Protease wurde jedenfalls bisher nicht erbracht. Eine Misslokalisierung des Kex2p als Grund für die fehlende Interaktion mit Pep12p ist sehr unwahrscheinlich, da ich durch zwei unabhängige Tests die Funktionalität des Fusionsproteins belegen konnte (siehe Abb 3.11 A und B).

Die Diskussion der möglichen Gründe für die nicht detektierbare Interaktion von Kex2- C_{UB} -RUra3p und N_{UB} -Pep12p weist auf eine spezielle Problematik hin. Sehr wahrscheinlich ist das Split-Ub-System nur bedingt verwendbar, die Wechselwirkung von Proteinen zu messen, die aufgrund komplexer Bewegungsabläufe ihre Lokalisation in der Zelle ständig ändern. Das Zusammentreffen und die Reassoziaton von N_{UB} und C_{UB} wird bei solchen Proteinpartnern deutlich erschwert und reflektiert nicht mehr den hauptsächlichen Aufenthaltsort der Proteine. Auf-

grund der von mir durchgeführten Experimente halte ich den Einsatz des Split-Ub-Systems für die Analyse solcher Protein-Protein-Wechselwirkungen für ungeeignet.

Wie für Sec63-C_{UB}-RUra3p (siehe Abb 3.5) so wurde auch für Kex2p als Markerprotein der Inhibitionstest in *Δubr1*-Zellen wiederholt. Entgegen den Erwartungen war das Wachstum dieser Zellen bei Koexpression von N_{UI}- und N_{UA}-Snc1p immer noch leicht eingeschränkt. Die Abwesenheit des N-End-Regel-Enzyms Ubr1p führte hier also nicht zur vollständigen Stabilisierung des abgespaltenen RUra3p. Eine mögliche Ursache könnte die Existenz eines weiteren, von der N-End-Regel unabhängigen Proteinabbaupfades sein. Warum dieser offenbar nicht bei Einsatz von Sec63-C_{UB}-RUra3p und Tom20-C_{UB}-RUra3p (nicht gezeigt) wirksam wird, bleibt ungeklärt.

4.2.4 Distanz zwischen Sec63p und Proteinen des späten sekretorischen Weges bzw. cytosolischen Proteinen

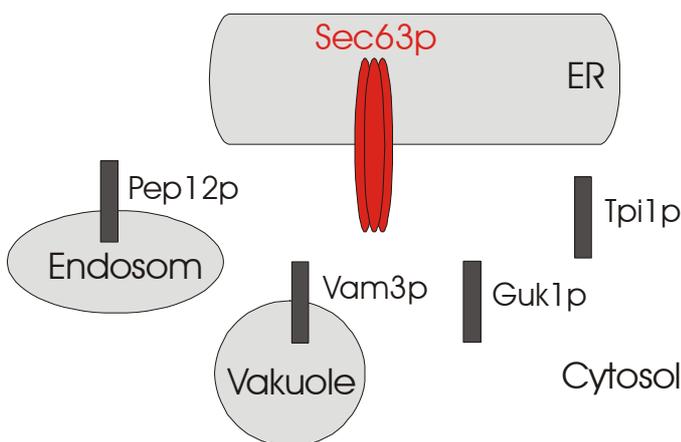


Abb 4.4: Schematische Darstellung der Lokalisation der Proteine, die im Interaktionstest mit Sec63-C_{UB}-RUra3p keine Wechselwirkung zeigten.

Für den Interaktionstest auf Uracil-freien Platten wurde Sec63p als C_{UB}-RUra3p-Fusionsprotein exprimiert. Pep12p, Vam3p, Tpi1p und Guk1p wurden als N_{UB}-Fusionsproteine mit Sec63-C_{UB}-RUra3p koexprimiert und die Wechselwirkung der modifizierten Proteine wurde analysiert.

Wie Abb 3.7 zeigt, wurde das Wachstum der C63R-5 51-Zellen bei Koexpression von N_{UB}-Pep12p, N_{UB}-Vam3p und den cytosolischen N_{UB}-Proteinen Tpi1p und Guk1p auf Ura⁻-Platten nicht beeinflusst. Die Proteine sind in sehr verschiedenen Zellregionen lokalisiert (Abb 4.4). Da für die Charakterisierung der Aufenthaltsorte dieser Proteine keine weiteren C_{UB}-RUra3p-Markerproteine eingesetzt wurden, konnte keine Unterscheidung zwischen ihnen erreicht werden. Die Ergebnisse des Wachstumstests gestatten lediglich die Aussage, dass diese Proteine eine größere Distanz zu Sec63p aufweisen als alle anderen eingesetzten Proteine.

4.2.5 Gegenselektion der C63R-5-51-Zellen auf FOA-haltigen Platten

Die Gegenselektion der C63R-5 51-Zellen auf FOA-haltigen Platten untermauerte die Ergebnisse des Wachstumstests auf Uracil-freien Platten (siehe Tab 3.1). Es konnte auch durch den Interaktionstest auf diesem Medium gezeigt werden, dass Sec63p zu den Translokonproteinen Sec62p und Sec61p die größte Nähe aufweist. Mit den N_{UA} -Fusionen der 14 N_{UB} -Proteine konnten die den Sec-Komplex bindenden Proteine von allen anderen Proteinen abgegrenzt werden. Nur N_{UA} -Sec62p und N_{UA} -Sec61p verliehen den Zellen FOA-Resistenz, alle anderen N_{UA} -Proteine, N_{UA} -Ssh1p eingeschlossen, konnten den Sec63- C_{UB} -RUra3p exprimierenden Zellen keine Resistenz gegen das Zellgift vermitteln.

4.3 Charakterisierung der Bindung zwischen Sec63p und Sec62p

Im ersten Teil dieser Arbeit gelang es mir mit der Split-Ub-Technik, die Interaktionen von Sec63p mit Komponenten des ER-Translokationskomplexes *in vivo* zu verfolgen. Hierbei zeigte sich, dass die Wechselwirkung zwischen Sec62p und dem Sec-Komplex mit Hilfe des Sec63- C_{UB} -RUra3p verlässlich gemessen werden kann. In einem nächsten Schritt untersuchte ich, wie das Sec62-Protein im Sec-Komplex verankert ist. Hierzu konstruierte ich Sec62p-Deletionsmutanten, die entweder am N-Terminus („ ΔN^c “), am C-Terminus („ ΔC^c “) oder an beiden Termini („ $\Delta N/\Delta C^c$ “) verkürzt waren. Die Funktionalität dieser Deletionsmutanten wurde in einem $\Delta sec62$ -Stamm und in einem temperatursensitiven *sec62-1*-Stamm getestet. Durch ein Konkurrenzexperiment wurde geprüft, wie stark die Deletionsproteine noch an den Sec-Komplex binden können. Hierbei wurde untersucht, in welchem Ausmaß die Deletionsmutanten in C63R-5 51-Zellen ein zusätzlich exprimiertes N_{UG} -Sec62p aus dem Sec-Komplex verdrängen können. Für die Auswertung des Auszählungsexperimentes wurden die unterschiedlichen Konzentrationen der Deletionsmutanten in der Zelle berücksichtigt. Die gezählte Kolonienzahl für jede Transformante wurde an das Expressionsniveau des entsprechenden Deletionsproteins angeglichen. Der für das wt-Sec62-Dha erhaltene, höchste Wert wurde willkürlich auf 100% gesetzt und die für die Mutanten errechneten Werte relativ dazu bezogen. Die so erhaltenen Werte wurden als „Konkurrenzeffizienz“ bezeichnet. Dieses Verfahren setzt eine lineare Korrelation zwischen der Proteinkonzentration der Deletionsmutanten und der Zahl der auf Ura⁻-Platten wachsenden Kolonien voraus. Diese Annahme vereinfacht wahrscheinlich die tatsächlichen Gegebenheiten. Einerseits kann es nur von einer gewissen Konzentrationsschwelle des konkurrierenden Proteins an überhaupt zu einer Konkurrenz kommen. Andererseits tritt ab einer gewissen Konzentration des konkurrierenden Proteins sicherlich eine Sättigungsphase ein. Es musste also gezeigt wer-

den, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Annahme der Proportionalität zwischen Proteinkonzentration und Anzahl der Kolonien zulässig ist. Das unter der Kontrolle des P_{MET25} -Promotors exprimierte Sec62-Dha wurde als kompetitierendes Protein in Zellen eingesetzt, die ebenfalls Sec63-C_{UB}-RUra3p und N_{UG}-Sec62p exprimierten. Durch die Einstellung der Methionin-Konzentration im Nährmedium konnte das Expressionsniveau des Sec62-Dha beeinflusst werden. Die Proteinmenge der Sec62-Dha wurde nach Proteinextraktion der Zellen auf einem Immunblot mit anti-ha-Antikörpern überprüft und quantifiziert. Gleichzeitig wurde mit diesen Transformanten der Auszählungstest durchgeführt. Es wurden drei voneinander unabhängige Auswertungen vorgenommen. Es ließ sich eine Korrelation zwischen Proteinkonzentration und der Anzahl der ausgezählten Kolonien feststellen. Diese Korrelation war jedoch nicht strikt linear. Dies musste also bei der Interpretation der gemessenen Konkurrenzeffizienzen berücksichtigt werden.

4.3.1 Sec62p besitzt mindestens zwei Bindungsdomänen an den Sec-Komplex und eine essentielle Domäne

Durch meine Experimente mit den Sec62p-Deletionsmutanten gelang es mir, verschiedene Regionen des Sec62p zu charakterisieren. Die Ergebnisse des Konkurrenztests mit den Sec62p-Deletionsmutanten dokumentieren die Existenz von mindestens zwei Sec-Komplex-Bindungsstellen im Sec62-Protein. Die erste Bindungsregion besteht aus dem cytosolischen N-Terminus des Sec62p, die zweite liegt am äußersten C-Terminus des Proteins und umfasst die Aminosäuren 248-283 (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Funktionalitätstests konnten die Region im Sec62p eingrenzen, die für die Funktion des Sec62p essentiell ist. Diese Domäne umfasst beide Transmembranregionen und einen an die zweite Transmembrandomäne angrenzenden C-terminalen Bereich des Proteins von ca. 40 Aminosäuren (siehe Abschnitt 3.3.1.2).

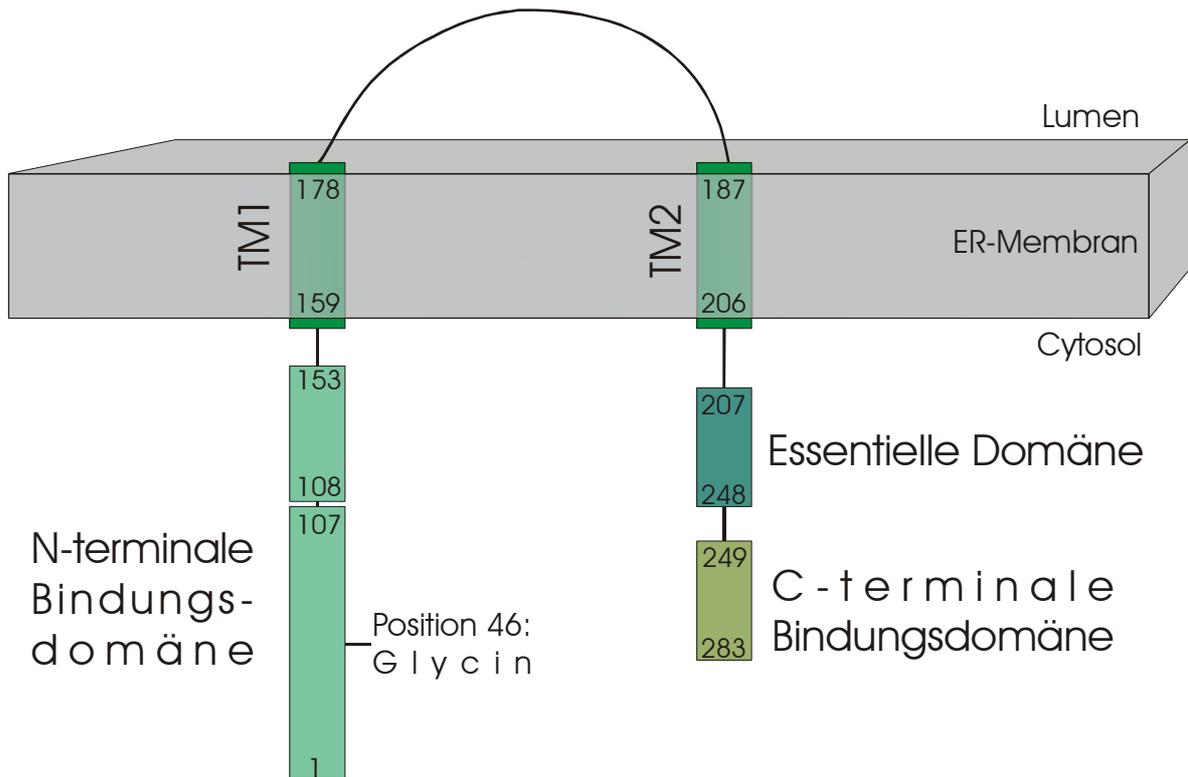


Abb 4.5: Ergebnis der strukturellen und funktionellen Charakterisierung des Sec62p.

Die schematische Darstellung des Sec62p-Moleküls zeigt dessen Topologie in der ER-Membran. Die Boxen in den unterschiedlichen Grüntönen kennzeichnen die einzelnen, charakterisierten Domänen des Sec62p. Die N-terminale Bindungsdomäne an den Sec-Komplex umfasst maximal die Aminosäuren 1 bis 107. Die Aminosäureposition 46, an der im sec62-1p der Austausch von Glycin zu Aspartat besteht, ist eingezeichnet. Im Bereich dieser Position befindet sich sehr wahrscheinlich die minimale Sec-Komplex-Bindungsregion des Sec62p. Die C-terminale Bindungsdomäne an den Sec-Komplex umfasst die Aminosäuren 248 bis 283. Die essentielle Domäne besteht aus beiden Transmembrandomänen, der luminalen Sec62p-Region und den Aminosäuren 201 bis 247, die der zweiten Transmembrandomäne direkt folgen.

TM1: Erste Transmembrandomäne, TM2: Zweite Transmembrandomäne.

4.3.1.1 Strukturelle Charakterisierung des Sec62p

4.3.1.1.1 Sec62p besitzt mindestens zwei Sec-Komplex-Bindungsregionen

Die Deletion der N-terminalen Bindungsstelle führte zum vollständigen Verlust der Konkurrenzeffizienz der entsprechenden Proteine ($\Delta N107$ -Dha bzw. $\Delta N153$ -Dha). $\Delta N107$ -Dha wies nur noch etwa 1% Konkurrenzeffizienz auf. Dieser Wert ist nicht signifikant. Da die Deletion von weiteren 46 Aminosäuren, die zu der Mutante $\Delta N153$ -Dha führten, keine weitere Auswirkung auf die Konkurrenzeffizienz des Proteins hatte (5% Konkurrenzeffizienz), umfasst der maximale Bindungsbereich des Sec62p-Aminoterminus an den Sec-Komplex somit die ersten 107 Aminosäuren (Siehe Diagr. 1). Die zweite, C-terminale Bindungsregion kann in zwei Bereiche eingeteilt werden. Die Verkürzung des Sec62p-Carboxyterminus um 19 Aminosäuren ($\Delta C19$ -Dha) senkte die Konkurrenzeffizienz des Proteins nur um ca. 20%. Die Deletion von zusätzli-

chen 16 Aminosäuren, resultierend in $\Delta C35$ -Dha, bewirkte dagegen eine Abnahme der Konkurrenzeffizienz um etwa 60%. Die ersten 19 Aminosäuren sind für die Bindung somit von geringerer Bedeutung als die darauffolgenden 16 Aminosäuren. Charakteristisch für diesen 16 Aminosäuren langen Proteinbereich ist eine hohe positive Ladungsdichte, die auch in den Sec62p-Molekülen aus anderen Spezies zu finden ist. Jede weitere Verkürzung des Sec62p-Carboxyterminus hatte keine negativen Auswirkungen auf die Bindung der jeweiligen Mutanten an den Sec-Komplex. Die Konkurrenzeffizienz von $\Delta C60$ -Dha stieg sogar wieder leicht an (siehe Diagr. 1). Da ich zeigen konnte, dass die Korrelation zwischen Proteinmenge und Kolonienanzahl nicht strikt linear ist, blieb offen, ob diese gesteigerte Konkurrenzeffizienz signifikant, d. h. wirklich auf eine erhöhte Bindungsfähigkeit des $\Delta C60$ -Dha an den Sec-Komplex zurückzuführen ist. Es ist möglich, dass vielleicht ein inhibitorischer Bereich des Sec62p in $\Delta C60$ -Dha deletiert wurde. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein zusätzliches Konkurrenzexperiment durchgeführt, bei dem darauf geachtet wurde, dass $\Delta C60$ -Dha und $\Delta C35$ -Dha ungefähr gleich stark exprimiert wurden. Zur Regulation des Expressionsniveaus von $\Delta C60$ -Dha wurde der P_{MET25} -Promotor und zur Expressionskontrolle von $\Delta C35$ -Dha der P_{GALI} -Promotor verwendet. In Galaktose-haltigem Medium ohne Methionin-Zugabe konnte eine Angleichung der Proteinnengen der beiden Deletionsmutanten erreicht werden. Unter diesen Bedingungen wurden dann für diese beiden Transformanten die auf Ura⁻-Platten gewachsenen Kolonien gezählt. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigte, dass $\Delta C60$ -Dha nicht signifikant besser als $\Delta C35$ -Dha an den Sec-Komplex binden kann. Der über die ersten 35 Aminosäuren des Sec62p hinausgehende, cytosolische C-Terminus ist also für die Bindung an den Sec-Komplex entbehrlich. Die Sec62p-Deletionsmutante, die neben diesem Teilstück auch noch die zweite Transmembrandomäne fehlte, interagiert wieder deutlich schlechter mit dem Sec-Komplex (siehe Diagr. 1). Möglicherweise reflektiert dies die Existenz einer dritten, unabhängigen Sec-Komplex-Bindungsdomäne. Vielleicht sinkt die Konkurrenzeffizienz auch nur deshalb, weil 1TM-Dha nicht korrekt in die ER-Membran inseriert wird. Mein Experiment konnte nicht ausschließen, dass die Abwesenheit der zweiten Transmembrandomäne zu einer fehlerhaften Ausrichtung des 1TM-Dha in der ER-Membran führt. Deshaies und Schekman konnten jedoch 1990 zeigen, dass eine ähnliche Sec62p-Deletionsmutante, die C-terminal mit Invertase fusioniert wurde, eine korrekte Topologie in der ER-Membran aufwies. Dies macht die richtige Topologie der Mutante 1TM-Dha sehr wahrscheinlich und unterstützt die Interpretation, dass die zweite Transmembranregion spezifisch zur Bindung an den Sec-Komplex beisteuert.

4.3.1.1.2 Der Aminoterminus des Sec62p ist notwendig und hinreichend für die Bindung an den Sec-Komplex

Ergebnisse von Experimenten mit Deletionsmutanten erlauben nur bedingt Rückschlüsse auf die Anwesenheit von autonomen Bindungsdomänen. Es musste daher unabhängig gezeigt werden, dass die N-terminale Region des Sec62p an den Sec-Komplex binden kann. Dies wurde im Konkurrenzexperiment nicht beobachtet (siehe Diagr. 1). Ich vermute, dass die zusätzliche C-terminale Bindungsdomäne und die korrekte Lokalisierung des N_{UG}-Sec62p in der ER-Membran verhindern, dass es von diesen beiden Deletionsmutanten aus dem Sec-Komplex verdrängt werden kann. Um die unmittelbare Interaktion des Sec62p-Aminoterminus mit dem Sec-Komplex zu untersuchen, wurde ein direkter Split-Ub-Test mit N_{UB}-markiertem 0TM-Dha durchgeführt. Mit diesem Experiment konnte ich die spezifische Interaktion der N-terminalen, cytosolischen Domäne des Sec62p mit Sec63-C_{UB}-RUra3p belegen (siehe Abb 3.21). Die Spezifität der Wechselwirkung des Sec63p mit dem Sec62p-Aminoterminus wurde durch die Beobachtung untermauert, dass die Deletion dieser Region im Sec62p (Δ N107-Dha) die Distanz zwischen mutiertem Sec62p und Sec63p drastisch vergrößerte. Durch ein weiteres Konkurrenzexperiment konnte ich schließlich die direkte Bindung des Sec62p-Aminoterminus an den Sec-Komplex belegen. Alle N_{UB}-markierten Deletionsmutanten, die noch einen intakten N-Terminus enthielten (Δ C35-Dha, Δ C60-Dha, 0TM-Dha) konnten effizient von wt-Sec62p aus dem Sec-Komplex verdrängt werden (Abb 3.22).

4.3.1.1.3 sec62-1p bindet nicht mehr effektiv an den Sec-Komplex

Eine wichtige Beobachtung war, dass Δ C60-Dha und Δ C76-Dha, wenn sie in hohen Konzentrationen im Hefestamm RSY529 exprimiert wurden, das Wachstum der *sec62-1*-Zellen bei der permissiven Temperatur inhibierten (siehe Abb 3.24). Diese Beobachtung trifft ebenfalls auf die Deletionsmutanten 0TM-Dha und 1TM-Dha zu. Die inhibitorisch wirkenden Sec62p-Deletionsmutanten scheinen also den Defekt der *sec62-1*-Zellen zu verstärken. Alle diese inhibitorisch wirkenden Sec62p-Mutanten haben zwei gemeinsame Charakteristika: Sie sind nicht funktionell und tragen den intakten Sec62p-Aminoterminus. Sobald dieser zusätzlich deletiert wird (Δ N107/ Δ C35-Dha, Δ N153/ Δ C60-Dha), tritt der dominant negative Effekt nicht mehr auf. Eine Erklärung dafür bietet das folgende Modell:

Die inhibitorisch wirkenden Deletionsproteine werden gemeinsam mit *sec62-1p* bei den permissiven Temperaturen in den RSY529-Zellen exprimiert. Ihre intakte N-terminale Bindungsregion verankert die C-terminalen Deletionsmutanten im Sec-Komplex. Das *sec62-1p* kann die fehlende Funktionalität dieser Mutanten kompensieren und die Zellen wachsen bei der permissiven Tem-

peratur gut. Werden die inhibitorischen Deletionsmutanten nun durch Induktion des Kupferpromotors in der Zelle überexprimiert, verdrängen sie sec62-1p aus dem Sec-Komplex. Da die inhibitorischen Deletionsproteine die Funktion des Sec62p nicht mehr ausüben können und das verdrängte sec62-1p diesen Defekt nicht mehr komplementieren kann, können die Hefezellen bereits bei der permissiven Temperatur nicht mehr wachsen.

Das geschilderte Modell legt die Vermutung nahe, dass sec62-1p schlechter an den Sec-Komplex binden kann als das wt-Protein. Aus diesem Grund wurde die dem *sec62-1*-Allel zugrunde liegende Mutation untersucht. Die Sequenzanalyse des Allels enthüllte eine Punktmutation, die zu dem Austausch der Aminosäuren Glycin zu Aspartat an Position 46 führt. Das negativ geladene Aspartat unterbricht im N-Terminus des Sec62p eine Abfolge eng benachbarter, positiv geladener Aminosäuren. Da sich die Mutation im N-Terminus des Proteins befindet, der meinen Experimenten zufolge die Hauptbindungsregion an den Sec-Komplex darstellt, könnte sich, wie vermutet, tatsächlich die Bindung des sec62-1p an den Sec-Komplex abschwächen. Diese Vorhersage wurde in einem Konkurrenzexperiment bestätigt. Bei gleicher Proteinkonzentration konnte sec62-1-Dha im Vergleich zu wt-Sec62-Dha nur 17% Konkurrenzeffizienz erreichen (siehe Diagr. 2). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Sec-Komplex-Bindungsstelle im Sec62p aus dem Sequenzabschnitt um die Aminosäure 46 (Glycin) gebildet wird. Diese N-terminale Region ist aber für das Wachstum der Hefen nicht essentiell. Warum führt eine Mutation in diesem Bereich zu temperatursensitivem Wachstum? Deshaies und Schekman beobachteten bereits 1990, dass die zelluläre Konzentration des sec62-1p im Gegensatz zu der des wt-Sec62p drastisch reduziert ist. Diese Beobachtung konnte ich bestätigen. Ich vermute daher, dass der Amino terminus des sec62-1p durch die Mutation strukturell verändert wird und bei hohen Temperaturen kollabiert. Dies wirkt möglicherweise als Signal für die schnelle Proteolyse des sec62-1p, was phänotypisch einer Deletion des *SEC62*-Gens ähnelt.

4.3.1.2 Funktionelle Charakterisierung des Sec62p

Das überraschendste Ergebnis der Funktionalitätsstudien war, dass sowohl der N-terminale Bindungsbereich als auch die C-terminale Bindungsregion für die Funktion des Sec62p nicht essentiell sind (siehe Abb 3.16). Allerdings ist die Funktionalität des $\Delta C35$ -Dha bereits leicht eingeschränkt. Erst die gemeinsame Deletion sowohl der N- als auch der C-terminalen Komplex-Bindungsstelle ($\Delta N107/\Delta C35$ -Dha), führt zum vollständigen Funktionalitätsverlust des Sec62p. Dies deutet darauf hin, dass eine Bindung an den Sec-Komplex für die Funktion des Sec62p grundsätzlich notwendig ist. Zwei Modelle könnten dies erklären: Sec62p ist wichtig für die strukturelle Integrität des Sec-Komplexes und daher ein essentielles Protein, oder die Bindungs-

stellen sind wichtig, um die eigentlich essentielle Domäne des Sec62p an den Komplex zu koppeln. Die Charakterisierung des $\Delta C60$ -Dha trug wesentlich zur Klärung dieser Frage bei. $\Delta C60$ -Dha ist die erste C-terminale Deletionsmutante, die nicht mehr funktionell ist. Gleichzeitig bindet diese Deletionsmutante stärker als $\Delta N107$ -Dha an den Sec-Komplex. $\Delta N107$ -Dha ist jedoch noch funktionell. Ich schließe daraus, dass der Proteinbereich um $\Delta C60$ -Dha eine Aufgabe erfüllt, die von der Bindung an andere Mitglieder des Sec-Komplexes getrennt werden kann. Diese Funktion wird auf der cytosolischen Seite der ER-Membran ausgeübt. Ich halte daher für wahrscheinlich, dass die essentielle Domäne des Sec62p direkt an der Signalsequenzerkennung beteiligt ist.

4.3.1.3 Die cytosolischen Termini des Sec62p sind nicht allein für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex verantwortlich

Ich konnte mit der Split-Ub-Methode die Regionen des Sec62p charakterisieren, die für dessen Bindung an den Sec-Komplex wichtig sind. Um entscheiden zu können, ob dieselben Regionen für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex verantwortlich sind, führte ich Koimmunpräzipitationsexperimente mit angereicherten Membranfraktionen durch. Die sowohl mit Membranen des wt-Stammes JD53 als auch mit Membranen des $\Delta sec62$ -Stammes verrichteten Koimmunpräzipitationen ergaben, dass keiner der cytosolischen Termini des Sec62p ausschließlich für die Bindung an den trimeren Sec61p-Komplex erforderlich ist. $\Delta C35$ -Dha und $\Delta C60$ -Dha waren ebenso in der Lage, Sec61p zu kopräzipitieren, wie $\Delta N107$ -Dha (Abb 3.29). Wichtig war vor allem die Beobachtung, dass $\Delta C60$ -Dha noch immer ähnlich gut wie die funktionellen Deletionsmutanten an den Sec61p-Komplex binden kann. Ich komme deshalb zu dem Schluss, dass die essentielle Region nicht für die Bindung des Sec62p an den trimeren Sec61p-Komplex verantwortlich ist. Meine Experimente schließen eine Beteiligung der Sec62p-Termini an der Bindung des Sec61p-Komplexes allerdings nicht aus. Möglicherweise binden beide Termini an den Sec61p-Komplex und bei Abwesenheit des einen Terminus kann der andere diesen Verlust ausgleichen. Um eine sichere Aussage treffen zu können, muss die Koimmunpräzipitation mit einer Doppelmutante ($\Delta N107/\Delta C35$ -Dha oder $\Delta N153/\Delta C60$ -Dha) wiederholt werden.

4.3.2 Die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p binden an den Sec62p-Aminoterminus

Deshaies und Schekman beobachteten 1990, dass der inhibitorische Effekt von bestimmten C-terminalen Sec62p-Deletionsmutanten durch die Überexpression von Sec63p gemildert werden konnte. Es erschien deshalb wahrscheinlich, dass Sec63p zumindest einer der Bindungspartner der N-terminalen Domäne des Sec62p ist. Der cytosolische Carboxyterminus von Sec63p ist

stark negativ geladen (Feldheim *et al.*, 1992). Von den 47 letzten Aminosäureresten bestehen allein 31 aus Aspartat oder Glutamat. Im Gegensatz dazu enthalten beide cytosolische Termini des Sec62p viele basische Aminosäuren und weisen daher eine positive Nettoladung auf. In mehreren Publikationen wurde bereits über eine mögliche Interaktion der beiden essentiellen Proteine, die über ihre entgegengesetzt geladenen Termini stattfinden könnte, spekuliert (Deshaies und Schekman, 1989; Deshaies und Schekman, 1990; Feldheim *et al.*, 1992). Die genetische Interaktion der mutanten Allele *sec63* und *sec62* erhöht die Wahrscheinlichkeit einer physikalischen Wechselwirkung der Proteine. Während *sec63*- und *sec62*-Einzelmutanten bei 24°C keinen Wachstumsdefekt aufweisen, ist die entsprechende Doppelmutante bei dieser Temperatur nicht mehr lebensfähig (Rothblatt *et al.*, 1989). Umgekehrt kann die Überexpression des Sec62p den temperatursensitiven Wachstumsdefekt des *sec63-1*-Stammes supprimieren (Deshaies und Schekman, 1990).

Die von mir durchgeführten Koimmunpräzipitationsexperimente dokumentieren erstmals, dass der cytosolische C-Terminus des Sec63p direkt an den cytosolischen N-Terminus des Sec62p bindet. Der Flag-Epitop-markierte Sec63p-Carboxyterminus von 419 Aminosäuren konnte effizient das Dha-markierte 0TM-Dha, nicht jedoch das ha-markierte Guk1p kopräzipitieren (siehe Abb 3.26). Darüber hinaus konnte ich den Bindungsbereich im Sec63-Protein noch weiter eingrenzen, indem ich zeigte, dass die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p notwendig und hinreichend für dessen Bindung an 0TM-Dha sind. Der Flag-markierte Sec63p-Carboxyterminus, dem die letzten 14 bzw. 47 Aminosäuren fehlten, war nicht mehr in der Lage, 0TM-Dha mit zu präzipitieren (siehe Abb 2.27). Dies zeigte, dass die letzten 14 Aminosäuren des Sec63p notwendig für die Bindung an den Sec62p-Aminoterminus sind. Dass diese Aminosäuren auch ausreichen, um die Bindung zu bewirken, bewiesen die Experimente mit den Flag-markierten Fpr1p-Fusionsproteinen. Die an den C-Terminus des cytosolischen Proteins Fpr1p fusionierten letzten 14 bzw. 47 Aminosäuren von Sec63p konnten 0TM-Dha, nicht aber N_{UI}-Guk1-Dha kopräzipitieren (siehe Abb 3.28). In dem umgekehrten Koimmunpräzipitationsexperiment wurde das intakte Flag-Fpr1-63C14 gemeinsam mit 0TM-Dha präzipitiert. Ein im Überstand erkennbares, wahrscheinlich durch Proteolyse am C-Terminus verkürztes Flag-Fpr1-63C14, welches also mehrere, wenn nicht alle der 14 Aminosäuren des Sec63p-Carboxyterminus verloren hatte, wurde nicht mehr mit 0TM-Dha präzipitiert (siehe Abb 3.28). Dies kann als zusätzlicher Beweis dafür dienen, dass nur die 14 Aminosäuren des Sec63p-Carboxyterminus, kein Bereich im Fpr1p, für die Bindung an 0TM-Dha verantwortlich war.

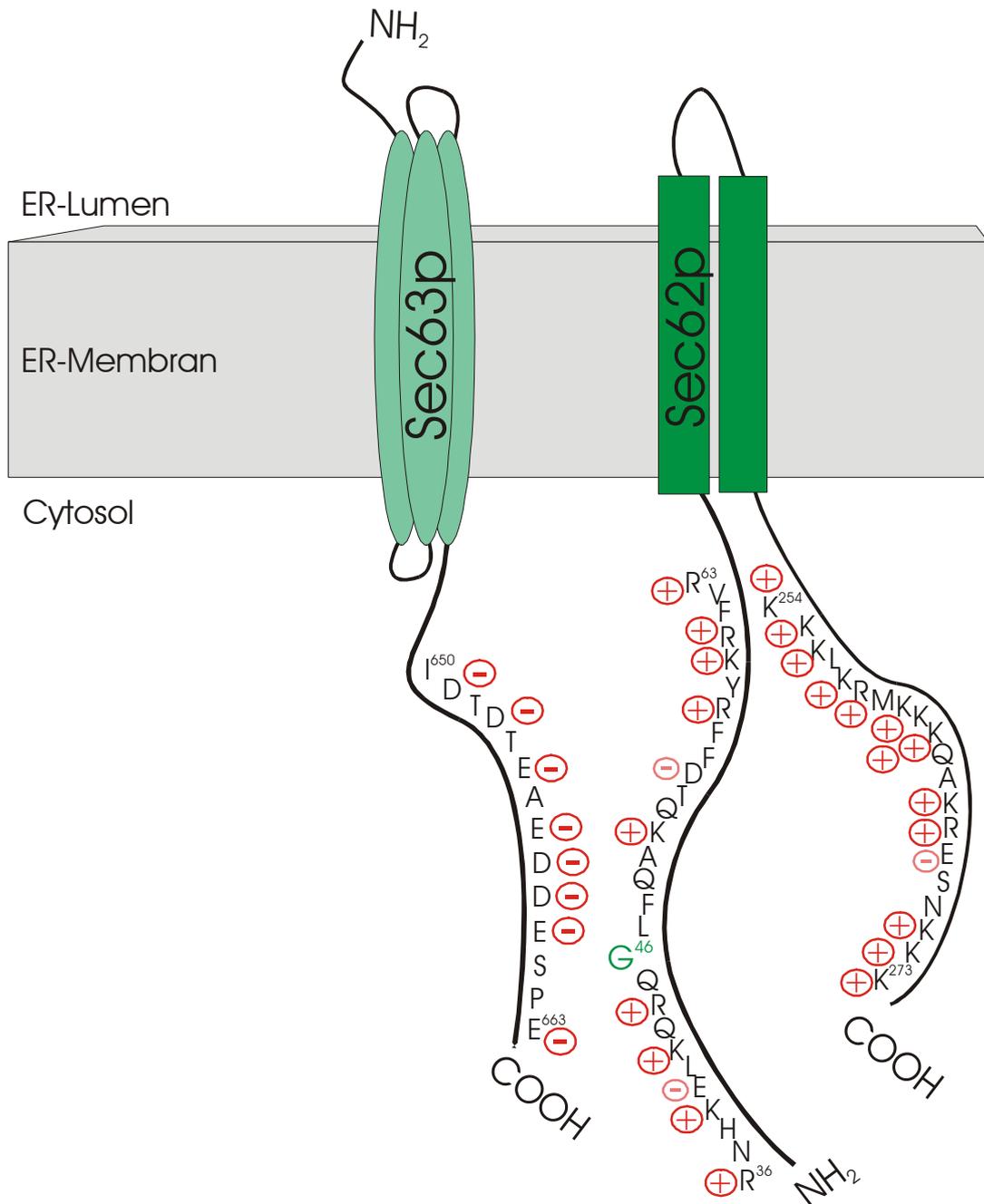


Abb 4.6: Schematische Darstellung der Bindung des negativ geladenen, 14 Aminosäuren langen Abschnitts des äußersten Sec63p-Carboxyterminus an die positiv geladene, N-terminale Domäne des Sec62p um Aminosäureposition 46 (Glycin).

Die 14 letzten Aminosäuren (I⁶⁵⁰-E⁶⁶³) des Sec63p-Carboxyterminus binden an die positiv geladene, N-terminale Domäne des Sec62p (R³⁶-R⁶³) um die Aminosäureposition 46 herum. Der zur Bindung an den Sec-Komplex beitragende, positiv geladene Abschnitt des Sec62p-Carboxyterminus (K²⁵⁴-K²⁷³) ist zusätzlich dargestellt.

Koimmunpräzitationsexperimente können prinzipiell nicht ausschließen, dass ein drittes Protein die Bindung der beiden analysierten Proteine vermittelt. Bei meinen Koimmunpräzitationsversuchen wurde die Gesamtproteinextraktion der Hefezellen in einem detergentenzfreien Puffer durchgeführt. Dies verhinderte die Ablösung von Membranproteinen aus der Membranfraktion,

so dass der für die Koimmunpräzipitation eingesetzte Überstand nur im Cytosol lösliche Proteine enthalten konnte. Ein cytosolisches Protein, das an der posttranslationalen Proteintranslokation beteiligt ist und die Brücke zwischen Sec62p und Sec63p bilden könnte, wurde bisher in *S. cerevisiae* nicht identifiziert. Das stärkste Argument ist jedoch, dass bei der Proteinfärbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S neben der schweren und leichten Kette der präzipitierten Antikörper nur die N-terminale Domäne und das um das C-terminale Sec63p-Peptid verlängerte Fpr1p im Verhältnis von ca. 1:1 nachgewiesen wurden. Ich halte die direkte physikalische Interaktion von Sec62p und Sec63p über die von mir definierten Proteindomänen daher für sehr wahrscheinlich.

4.3.3 Funktion des Sec63p-Carboxyterminus

Was charakterisiert diesen äußersten, C-terminalen Bindungsbereich des Sec63p? Von den 14 C-terminalen Aminosäuren sind in *S. cerevisiae* allein 8 negativ geladen. Die äußersten Carboxytermini der Sec63p-Homologen in *Caenorhabditis elegans* und *Homo sapiens* haben eine noch größere negative Ladungsdichte. Dies lässt eine hohe evolutionäre Konservierung der Bindung des positiv geladenen Sec62p-Aminoterminus und des negativ geladenen Sec63p-Carboxyterminus vermuten. Die einfachste Erklärung ist, dass der positiv geladene N-Terminus des Sec62p und der entgegengesetzt geladene C-Terminus des Sec63p über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren. Diese Interaktion ist für die Effizienz der posttranslationalen Translokation allerdings nicht essentiell. Zellen, die nur $\Delta N107$ -Dha exprimieren (Stamm $\Delta sec62 \Delta N107$ -Dha) sind lebensfähig und weisen nur einen relativ moderaten Translokationsdefekt auf (M. Dünwald, pers. Mitteilung). Zellen, die nur ein am Carboxyterminus um 27 Aminosäuren verkürztes Sec63p (sec63-201p) exprimieren, sind ebenfalls in der Proteintranslokation behindert und lebensfähig (Ng und Walter, 1996). Die phänotypische Ähnlichkeit beider Effekte bestätigt indirekt, dass beide Domänen während der Translokation nur für eine Bindung zwischen Sec62p und Sec63p benötigt werden. Allerdings führt das *sec63-201*-Allel zusätzlich zu einem starken Karyogamie-Defekt der Zellen. Exprimieren beide Paarungspartner dieses mutierte Protein, können ihre Kernmembranen nicht mehr miteinander verschmelzen. Gleichzeitig sind Sec71p und Sec72p zwar noch stabil mit sec63-201p assoziiert, die Menge an kopräzipitiertem Sec62p ist jedoch reduziert (Ng und Walter, 1996). Eine Beteiligung von Sec62p an der Karyogamie konnte nicht nachgewiesen werden (Ng und Walter, 1996; Brizzio *et al.*, 1999). Der negativ geladene Sec63p-Carboxyterminus ist also neben seiner Funktion, Sec62p im Sec62p/Sec63p-Komplex zu verankern, wichtig für den davon vollkommen verschiedenen Prozess der Fusion zweier Kernmembranen. Da auch Sec71p und Sec72p eine Rolle während der

Karyogamie spielen (Ng und Walter, 1996; Brizzio *et al.*, 1999), scheint sich zu diesem Zweck ein trimerer Sec63p/Sec71p/Sec72p-Subkomplex zu bilden. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Sec62p bezüglich Sec63p in einem etwa fünffachen zellulären Überschuss vorliegt (Deshaies *et al.*, 1991). Möglicherweise maskiert Sec62p mittels seines basischen N-Terminus den sauren C-Terminus des Sec63p und unterdrückt so die ungewollte Fusion von Kernmembranen in haploiden Zellen. Innerhalb eines Paarungsvorganges zwischen zwei Hefezellen dissoziiert Sec62p dann von dem putativen Sec63p/Sec71p/Sec72p-Subkomplex ab und ermöglicht ihm so das Eingreifen in die Fusion der Kernmembranen. Es ist eine noch offene Frage, ob ein solcher Subkomplex in der lebenden Zelle existiert und wenn ja, wie er spezifisch in diploiden Zellen während der Karyogamie generiert wird.

4.3.4 Analyse von Sec62p-Homologen aus anderen Spezies

Erst relativ spät wurden Homologe des *S. cerevisiae*-Sec62p in anderen Organismen entdeckt. Noël und Cartwright identifizierten 1994 das erste homologe Protein zu Sec62p aus *S. cerevisiae*. Sie entdeckten ein Gen in *Drosophila melanogaster*, welches ein Protein mit Sequenzhomologie zum Sec62p aus *S. cerevisiae* kodiert (Dtrp1). Die Sequenzhomologie erstreckt sich hauptsächlich über den Bereich der Transmembrandomänen und den Carboxyterminus des Proteins. Die Autoren zeigten, dass Dtrp1 in einem $\Delta sec62$ -Hefestamm die Abwesenheit des Hefe-Sec62p komplementieren kann. Mittlerweile wurden insgesamt 6 Sequenzen von Sec62p-Homologen aus dem Tierreich (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens*) und dem Reich der Pilze (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*) veröffentlicht (Übersicht in Meyer *et al.*, 2000). Alle Sec62p-Homologe haben höchstwahrscheinlich zwei Transmembrandomänen. Ihre Sequenzhomologie ist besonders im Bereich dieser Transmembranregionen sowie in deren unmittelbarer Umgebung sehr groß. Erst kürzlich berichteten Meyer *et al.*, dass das humane Sec62p-Homologe mit dem trimeren Sec61-Komplex aus *H. sapiens* koimmunpräzipitiert werden konnte. Diese Assoziation konnte nur in Abwesenheit von Ribosomen beobachtet werden (Meyer *et al.*, 2000). Diese Daten geben einen starken Hinweis darauf, dass auch das humane Sec62p-Homologe nicht an der kotranslationalen Translokation beteiligt ist.

Ich analysierte in dieser Arbeit die Sec62p-Homologen von *Y. lipolytica*, *S. pombe* und *H. sapiens*. Ich konnte die Daten von Swennen *et al.* bestätigen, nach denen Sec62_{YL}, das am nächsten mit Sec62_{SC} verwandte Sec62p-Homologe, in *S. cerevisiae* funktionell ist (siehe Abb 3.32). Zusätzlich belegte ich erstmals die Funktionalität von Sec62_{SP} in *S. cerevisiae*-Zellen (siehe Abb 3.32). Die Funktionalitätsanalyse des Sec62_{HS} ergab, dass das humane Sec62p-Homologe das

Sec62_{SC} nicht ersetzen kann. Aus dem Plasmid-Shuffling-Experiment erhielt ich allerdings einige wenige, sehr kleine Zellen. Der Geno- und Phänotyp dieser Zellen muss noch untersucht werden, um entscheiden zu können, ob sie Sec62_{HS}-Dha als einziges Sec62-Protein exprimieren.

Durch das Konkurrenzexperiment mit den Sec62p-Homologen aus den verschiedenen Spezies konnte ich dokumentieren, dass Sec62_{SP}-Dha an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* binden kann (siehe Diagr. 3). Für Sec62_{YL}-Dha scheiterte das Experiment wahrscheinlich an der zu geringen Konzentration des Proteins in der Zelle. Entweder wird das Protein in nicht ausreichendem Maße synthetisiert oder es wird nach seiner Expression schnell abgebaut. Die Ursache hierfür ist allerdings unklar. Ich würde vorhersagen, dass durch eine Erhöhung des Expressionsniveaus des Sec62_{YL}-Dha eine solche Steigerung der Konkurrenzeffizienz erreicht werden kann, dass die Bindung dieses Proteins an den Sec-Komplex bestätigt werden könnte. Obwohl Sec62_{HS}-Dha in ausreichenden Mengen exprimiert wird, kann es nicht an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* binden. Ich konnte zeigen, dass der Hauptbindungsbereich des Sec62_{SC} an den Sec-Komplex am N-Terminus des Proteins in der Umgebung der Aminosäure 46 (Glycin) lokalisiert ist. Bei dem Sequenzvergleich der Sec62p-Homologen kann man beobachten, dass die N-Termini der Sec62p-Proteine aus dem Pilzreich untereinander relativ ähnlich sind und ebenfalls die N-Termini der Sec62p-Homologen der Tiere eine relativ enge Verwandtschaft aufweisen (nicht gezeigt). Die Sequenzen zwischen Tier- und Pilz-Homologen weichen jedoch sehr viel stärker voneinander ab. Die Ergebnisse, dass zwar Sec62_{SP}-Dha (und sehr wahrscheinlich auch Sec62_{YL}-Dha) an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* binden können, nicht aber Sec62_{HS}-Dha stehen somit im Einklang mit der von mir erbrachten Definition der Sec-Komplex-Bindungsregion im Sec62p der Hefe *S. cerevisiae*.

4.4 Ausblick

Ich konnte mit Hilfe des Split-Ub-Tests eine starke Wechselwirkung zwischen Sec63-C_{UB}-RUra3p und seinen Bindungspartnern N_{UB}-Sec62p bzw. N_{UB}-Sec61p sowohl auf Uracil-freien (kein Wachstum der Zellen bedeutet Interaktion) als auch auf FOA-haltigen (Wachstum der Zellen bedeutet Interaktion) Nährplatten nachweisen (siehe Tab 3.1). Die positive Selektion auf FOA-haltigen Platten bietet die Möglichkeit, im Interaktionstest mit N_{UA}-Fusionsproteinen neue Bindungspartner des Sec63p identifizieren zu können. Neben seiner Rolle bei der posttranslationalen Translokation wurde die Beteiligung des Sec63p an der Kernfusion beschrieben (Ng und Walter, 1996; Brizzio *et al.*, 1999). Während die für die Translokation wichtigen Bindungspartner des Sec63p wahrscheinlich bereits alle bekannt sind, ist die Existenz weiterer, an der Kernfusion beteiligter, Sec63p-bindender Proteine möglich. Um solche Bindungspartner zu identifizie-

ren werden C63R-5 51-Zellen mit einer genomischen DNA-Bank transformiert, deren DNA-Fragmente eine N-terminale N_{UA} -Fusion tragen. Nach Ausplattierung der Transformanten auf FOA-haltige Platten sollten nur die Zellen wachsen können, die ein Sec63p-bindendes N_{UA} -Fusionsprotein exprimieren. Das für dieses Protein kodierende ORF kann aus den Hefen isoliert und durch Sequenzanalyse identifiziert werden. Eine solche auf dem Split-Ub-System beruhende Selektion konnte bereits einmal erfolgreich durchgeführt werden (H. Laser, pers. Mitteilung). Hierbei wurde das bereits bekannte Protein NHP6b als neuer Bindungspartner von Tub1p identifiziert.

Ich konnte zeigen, dass die letzten 14 Aminosäuren des cytosolischen Sec63p-Carboxyterminus direkt an den cytosolischen N-Terminus von Sec62p binden (siehe Abschnitt 3.3.6). Es wäre von Interesse, die Bindungsregionen zwischen Sec62p und Sec63p noch detaillierter zu untersuchen. Beispielweise könnte durch den gezielten Austausch von Aminosäuren die Region im Sec62p-Aminoterminus, die für die Bindung an Sec63p verantwortlich ist, identifiziert werden. Hierbei kann der Sequenzvergleich von Sec62p- und Sec63p-Homologen aus verschiedenen Spezies hilfreich sein, denn diese Bindung ist höchstwahrscheinlich evolutionär konserviert. Die letzten 14 Aminosäuren des humanen Sec63p-Homologen weisen eine noch stärkere negative Ladungsdichte auf als das Sec63p aus *S. cerevisiae*. Die Sequenzhomologie dieses Proteinbereichs ist gleichzeitig nicht sehr hoch. Durch Koimmunpräzipitationsexperimente ließe sich untersuchen, ob die letzten Aminosäuren des Sec63p-Homologen aus *H. sapiens* an den N-Terminus von Sec62p aus *S. cerevisiae* binden können. Dies würde die Frage beantworten, ob allein die negativen Ladungen des Sec63p-Carboxyterminus die Bindung an den positiv geladenen Sec62p-Aminoterminus bewirken, oder ob eine bestimmte Aminosäuresequenz im C-Terminus des Sec63p dazu benötigt wird.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Split-Ub-Methode die *in vivo*-Interaktion zwischen ER-Membranproteinen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese neue Methode geeignet ist, die Wechselwirkungen von Membranproteinen an ihrem natürlichen Ort in der lebenden Zelle zu messen.

Mit Sec63p und Sec62p wurden zwei Komponenten des ER-Translokationsapparates analysiert. Sec63p wurde hierzu C-terminal mit den beiden Reporterprotein-Modulen C_{UB}-Dha bzw. C_{UB}-RUra3p fusioniert (Sec63-C_{UB}-Dha bzw. Sec63-C_{UB}-RUra3p). Sec62p wurde an seinem N-Terminus mit N_{UB} verlängert (N_{UI}-, N_{UA}- und N_{UG}-Sec62p). Mit beiden Reportersystemen konnte eine enge Wechselwirkung zwischen Sec63p und Sec62p gemessen werden. Durch die Verwendung eines Kompetitionstests konnte erstmals *in vivo* die direkte Bindung von Sec62p an den Sec-Komplex nachgewiesen werden.

In einem nächsten Schritt konnte mit Sec63-C_{UB}-RUra3p als Markerprotein und durch den Einsatz verschiedener N_{UB}-Fusionsproteine bekannter Lokalisation eine grobe Kartierung des molekularen Umfeldes des Sec63p vorgenommen werden. Die größte Nähe zeigte Sec63-C_{UB}-RUra3p zu Komponenten des Translokationsapparates. Hierbei konnte mit Hilfe der N_{UA}- und N_{UG}-Versionen der Fusionsproteine eindeutig zwischen Sec63p-bindenden und nicht-bindenden Proteinen unterschieden werden. Im Vergleich zu den Membranproteinen anderer Kompartimente war Sec63-C_{UB}-RUra3p auch zu ER-Membranproteinen, die nicht an der Translokation beteiligt sind, eng benachbart. N_{UB}-Ssh1p exprimierende Zellen unterschieden sich hierbei nicht von den Zellen, die andere N_{UB}-modifizierte ER-Membranproteine exprimierten, die kein Bestandteil des ER-Translokationsapparates sind. Die Resultate belegen, dass Ssh1p *in vivo* nicht an den tetrameren Sec-Komplex bindet und deshalb wahrscheinlich nicht an der posttranslationalen Translokation partizipiert. Erst durch den Einsatz der neuen N_{UB}-Version N_{VI} gelang es, Sed5p von den ER-Membranproteinen zu unterscheiden und es im Vergleich mit N_{VI}-Sft1p, N_{VI}-Snc1p und N_{VI}-Sso1p dem frühen Golgi-Apparat zuzuordnen. Durch Einsatz zweier neuer C_{UB}-Markerproteine konnten das mitochondriale und das Golgi-Kompartiment charakterisiert werden. Das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Tom20-C_{UB}-RUra3p zeigte eine spezifische Nähe zu dem mitochondrialen N_{UB}-Tom22p. Das in der Membran des *trans*-Golgi-Kompartiments lokalisierte Kex2-C_{UB}-RUra3p-Fusionsprotein wies die größte Nähe zu Snc1p (spätes Golgi/Plasmamembran) und Sso1p (Plasmamembran) auf.

Im dritten Abschnitt der Arbeit wurde Sec62p strukturell und funktionell analysiert und seine Bindung an den heptameren Sec-Komplex charakterisiert. Mit Hilfe des Split-Ub-Systems konn-

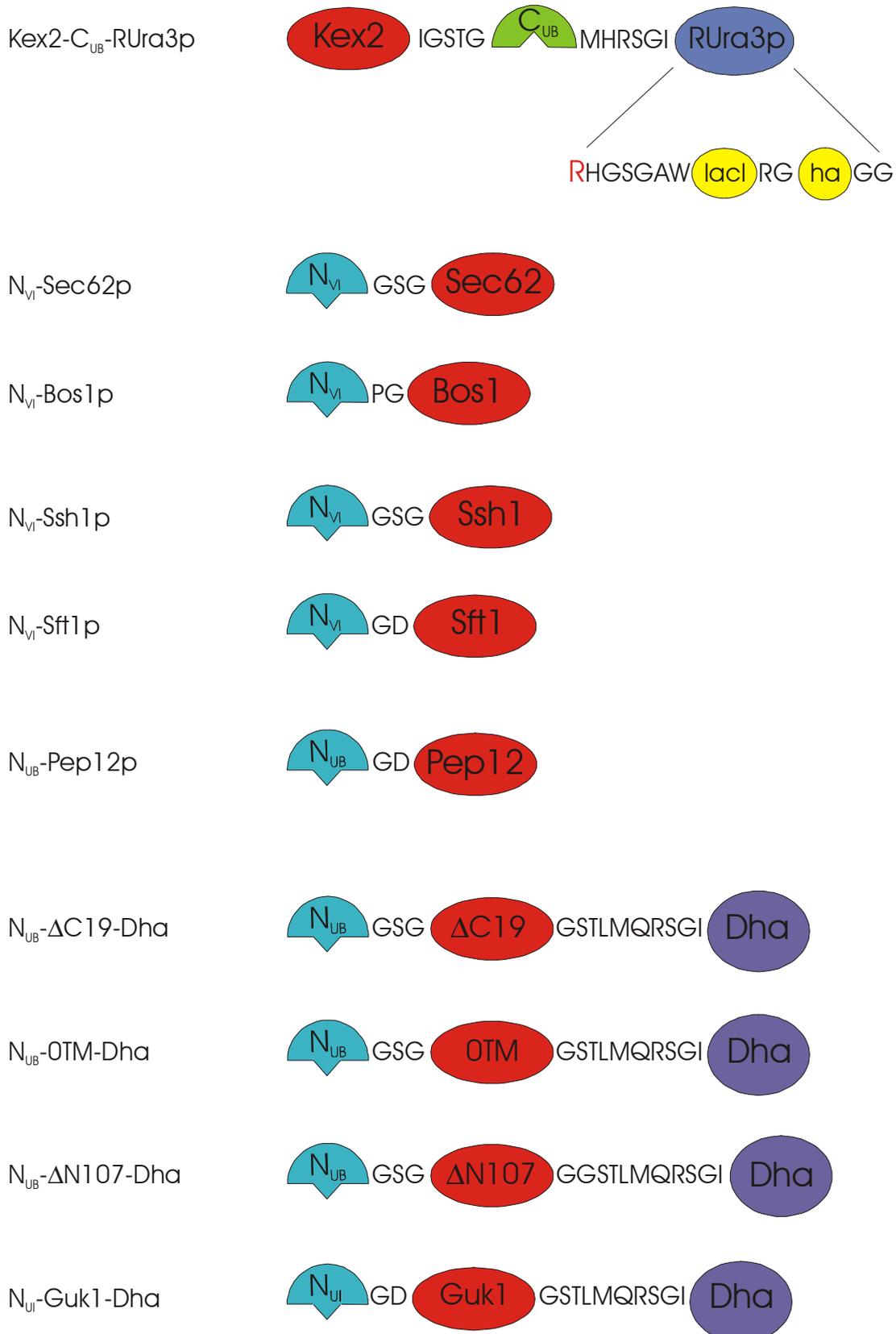
te festgestellt werden, dass Sec62p mindestens zwei Regionen enthält, die an den Sec-Komplex binden können. Die Hauptbindungsdomäne besteht aus den ersten 107 Aminosäuren des Sec62p-Aminoterminus. Sie ist für die starke Bindung an den Sec-Komplex notwendig und hinreichend. Die zweite, weniger affine Bindungsstelle umfasst die letzten 35 Aminosäuren des Sec62p. Möglicherweise wird eine dritte Sec-Komplex-Bindungsregion von der zweiten Transmembrandomäne gebildet. Durch die Analyse des mutanten Proteins sec62-1p, welches an Position 46 den Aminosäureaustausch Glycin zu Aspartat trägt, konnte die N-terminale Bindungsregion des Sec62p um den Bereich des Glycins an Position 46 des Proteins lokalisiert werden.

Sowohl die N- als auch die C-terminale Sec-Komplex-Bindungsregion des Sec62p sind für die Funktion des Proteins nicht essentiell. Erst die gemeinsame Deletion beider Bindungsstellen führt zu einem nicht funktionellen Protein. Die Bindung des Sec62p an den Sec-Komplex ist somit funktionell unentbehrlich. Die eigentliche essentielle Domäne des Sec62p erstreckt sich über beide Transmembrandomänen, den luminalen Teil des Proteins und die Region, die der zweiten Transmembrandomäne direkt folgt (insgesamt die Aminosäuren 154-247). Die nicht funktionellen, C-terminalen Sec62p-Deletionsmutanten binden noch effizient an den Sec62p/Sec63p-Komplex und an den trimeren Sec61p-Komplex. Möglicherweise zerstören die Deletionen die Fähigkeit von Sec62p, Signalsequenzen zu translozierender Proteine zu erkennen. Durch Koimmunpräzitationsexperimente konnte die Domäne im Sec63p definiert werden, die an die cytosolische N-terminale Bindungsdomäne des Sec62p bindet. Sie umfasst die letzten 14 Aminosäuren des cytosolischen Sec63p-Carboxyterminus.

Bei der Analyse von Sec62p-homologen Proteinen aus anderen Spezies konnte die Funktionalität des Sec62p-Homologen aus *Y. lipolytica* in *S. cerevisiae*-Zellen bestätigt werden. Die Funktionalität des Sec62p-Homologen aus *S. pombe* konnte erstmals in der Bäckerhefe dokumentiert und seine Bindung an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Das Sec62p-Homologe aus *H. sapiens* dagegen ist in der Bäckerhefe nicht funktionell und kann nicht an den Sec-Komplex aus *S. cerevisiae* binden.

6 Anhang

Die in dieser Arbeit erstellten Fusionsproteine:

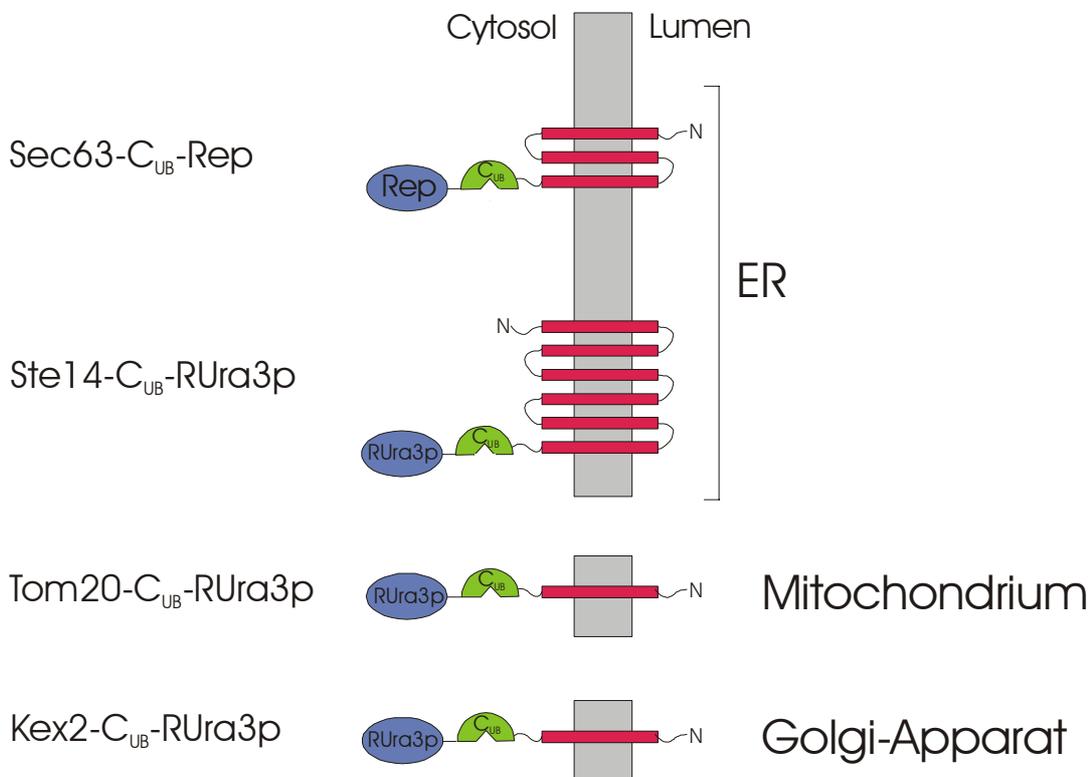


| | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------|-----|
| Sec62-Dha | Sec62 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| Δ C19-Dha | Δ C19 | GSTLMQRSGI | Dha |
| Δ C35-Dha | Δ C35 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| Δ C60-Dha | Δ C60 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| Δ C76-Dha | Δ C76 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| Δ N107-Dha | Δ N107 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| Δ N153-Dha | Δ N153 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| Δ N107/ Δ C35-Dha | Δ N107/ Δ C35 | STLMQRSGI | Dha |
| Δ N153/ Δ C60-Dha | Δ N153/ Δ C60 | GGSTLMQRSGI | Dha |
| 1TM-Dha | 1TM | GSTLMQRSGI | Dha |
| OTM-Dha | OTM | GSTLMQRSGI | Dha |

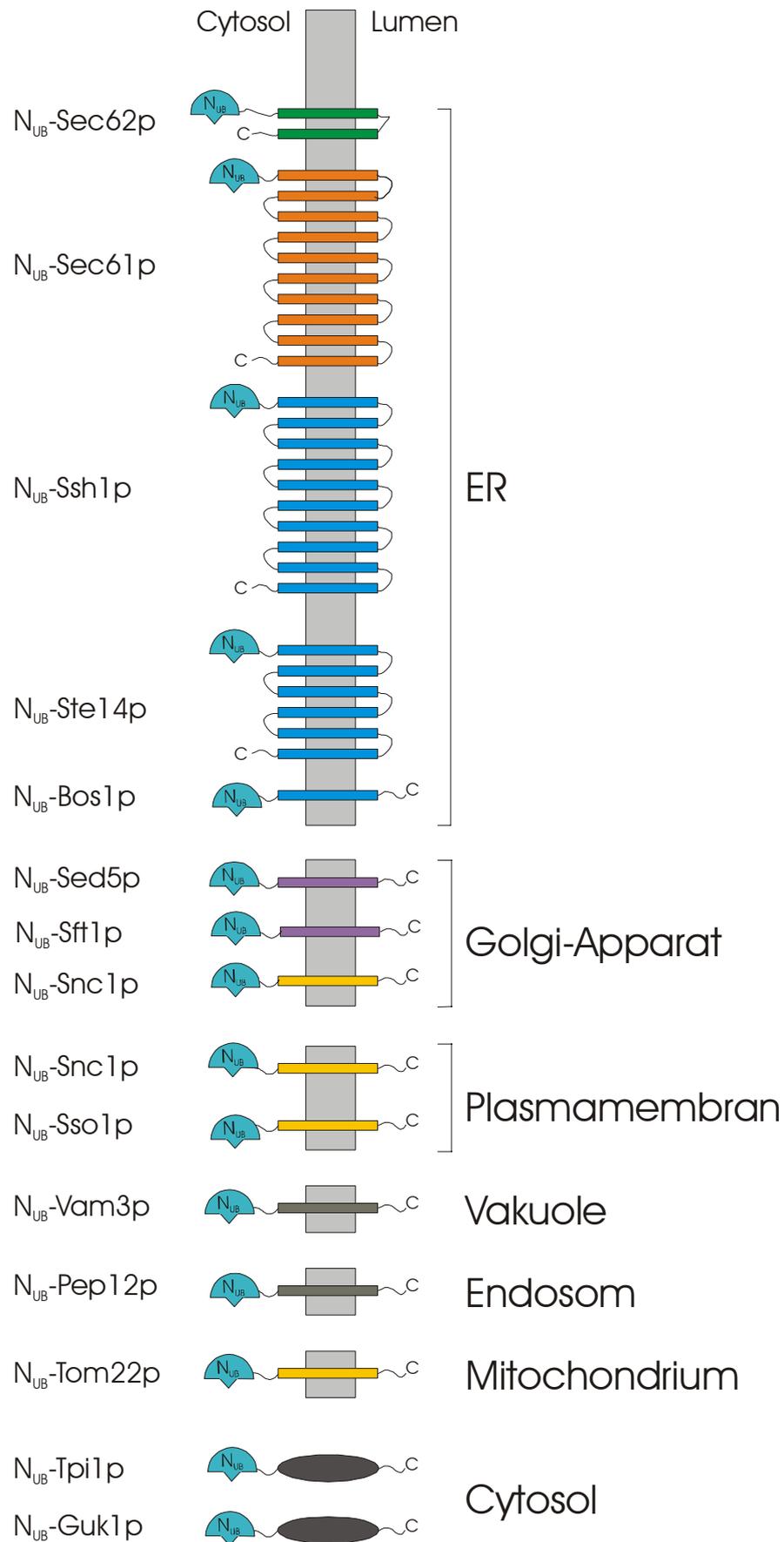


Lokalisation der in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine:

C_{UB}-Fusionsproteine:



N_{UB} -Fusionsproteine:



7 Literaturverzeichnis

- Aalto, M. K., Ronne, H. und Keranen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *Embo J* **12**(11), 4095-104.
- Alber, T. und Kawasaki, G. (1982). Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Appl Genet* **1**(5), 419-34.
- Amaya, Y., Nakano, A., Ito, K. und Mori, M. (1990). Isolation of a yeast gene, SRH1, that encodes a homologue of the 54K subunit of mammalian signal recognition particle. *J Biochem (Tokyo)* **107**(3), 457-63.
- Amaya, Y. und Nakano, A. (1991). SRH1 protein, the yeast homolog of the 54 kDa subunit of signal recognition particle, is involved in ER translocation of secretory proteins. *FEBS Lett* **283**, 325-32.
- 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**, 179-86.
- Baker, R. T., Tobias, J. W. und Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of *UBP2* and *UBP3*, and functional analysis of the *UBP* gene family. *J Biol Chem* **267**(32), 23364-75.
- Banfield, D. K., Lewis, M. J., Rabouille, C., Warren, G. und Pelham, H. R. (1994). Localization of Sed5, a putative vesicle targeting molecule, to the *cis*-Golgi network involves both its transmembrane and cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **127**(2), 357-71.
- Becherer, K. A., Rieder, S. E., Emr, S. D. und Jones, E. W. (1996). Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol Biol Cell* **7**(4), 579-94.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. und Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex [see comments]. *Science* **278**(5346), 2123-6.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975a). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**(3), 835-51.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975b). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**(3), 852-62.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. und Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**, 164-75.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

- Brizzio, V., Khalfan, W., Huddler, D., Beh, C. T., Andersen, S. S., Latterich, M. und Rose, M. D. (1999). Genetic interactions between *KAR7/SEC71*, *KAR8/JEM1*, *KAR5*, and *KAR2* during nuclear fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**(3), 609-26.
- Brodsky, J. L., Goekeler, J. und Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21), 9643-6.
- Brodsky, J. L. und Schekman, R. (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1), 1355-63.
- Cereghino, J. L., Marcusson, E. G. und Emr, S. D. (1995). The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol Biol Cell* **6**(9), 1089-102.
- Conchon, S., Cao, X., Barlowe, C. und Pelham, H. R. (1999). Got1p and Sft2p: membrane proteins involved in traffic to the Golgi complex. *Embo J* **18**(14), 3934-46.
- 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**(5010), 1171-3.
- Corsi, A. K. und Schekman, R. (1997). The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **137**(7), 1483-93.
- 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**(3), 461-71.
- Daimon, M., Susa, S., Suzuki, K., Kato, T., Yamatani, K. und Sasaki, H. (1997). Identification of a human cDNA homologue to the *Drosophila* translocation protein 1 (Dtrp1). *Biochem Biophys Res Commun* **230**(1), 100-4.
- Darsow, T., Rieder, S. E. und Emr, S. D. (1997). A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J Cell Biol* **138**(3), 517-29.
- 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**(6312), 806-8.
- Deshaies, R. J. 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**(2), 633-45.
- Deshaies, R. J. und Schekman, R. (1989). *SEC62* encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1), 2653-64.
- 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**(11), 6024-35.

- Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. und Varshavsky, A. (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* **270**(30), 18099-109.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. und Johnsson, N. (1999). Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **10**(2), 329-44.
- 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**(9), 933-42.
- 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**(7), 3288-96.
- Feldheim, D., Yoshimura, K., Admon, A. und Schekman, R. (1993). Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **4**(9), 931-9.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230), 245-6.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., 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 of *S. cerevisiae*. *Embo J* **15**(7), 1482-94.
- Finley, D. und Chau, V. (1991). Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 25-69.
- Franzusoff, A., Redding, K., Crosby, J., Fuller, R. S. und Schekman, R. (1991). Localization of components involved in protein transport and processing through the yeast Golgi apparatus. *J Cell Biol* **112**(1), 27-37.
- Fuller, R. S., Brake, A. und Thorner, J. (1989a). Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(5), 1434-8.
- Fuller, R. S., Brake, A. J. und Thorner, J. (1989b). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**(4929), 482-6.
- Fuller, R. S., Sterne, R. E. und Thorner, J. (1988). Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu Rev Physiol* **50**, 345-62.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. und Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**(6), 1425.
- Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P. (1982a). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* **95**(2 Pt 1), 463-9.
- Gilmore, R., Walter, P. und Blobel, G. (1982b). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* **95**(2 Pt 1), 470-7.

- Glick, B. S. (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* **80**(1), 11-4.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U. und Rapoport, T. A. (1992). A mammalian homolog of Sec61p and SecY is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**(3), 489-503.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-24.
- 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 [see comments]. *Cell* **87**(4), 721-32.
- Hann, B. C., Poritz, M. A. und Walter, P. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* contain a homologue to the 54-kD subunit of the signal recognition particle that in *S. cerevisiae* is essential for growth. *J Cell Biol* **109**, 3223-3230.
- Hann, B. C. und Walter, P. (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* **67**(1), 131-44.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T. A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex [see comments]. *Nature* **367**(6464), 654-7.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807.
- Hinnen, A., Hicks, J. B. und Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(4), 1929-33.
- Holthuis, J. C., Nichols, B. J., Dhruvakumar, S. und Pelham, H. R. (1998). Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *Embo J* **17**(1), 113-26.
- Ito, K. (1984). Identification of the secY (prlA) gene product involved in protein export in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **197**(2), 204-8.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994a). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10340-4.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994b). Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *Embo J* **13**(11), 2686-98.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. und Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* **37**(3), 1075-89.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I. J., Pfanner, N. und Neupert, W. (1993). The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* **74**(3), 483-92.

- Konrad, M. (1992). Cloning and expression of the essential gene for guanylate kinase from yeast. *J Biol Chem* **267**(36), 25652-5.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4), 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lewke, N. (1999). Die zelluläre Verteilung der Prenylcystein Carboxylmethyltransferase Ste14p und ihres potentiellen Substrates Cdc42p in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation an der Universität zu Köln.
- Lipp, J., Dobberstein, B. und Haeuptle, M. T. (1987). Signal recognition particle arrests elongation of nascent secretory and membrane proteins at multiple sites in a transient manner. *J Biol Chem* **262**(4), 1680-4.
- Lyman, S. K. und Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **131**(5), 1163-71.
- Lyman, S. K. und Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* **88**(1), 85-96.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marsh, L. und Rose, M. D. (1997). The pathway of cell and nuclear fusion during mating in *S. cerevisiae*. In: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Cell Cycle and Cell Biology, ed. J. R. Pringle, J. R. Broach und E. W. Jones, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 827-888.
- Martin, C. und Young, R. A. (1989). *KEX2* mutations suppress RNA polymerase II mutants and alter the temperature range of yeast cell growth. *Mol Cell Biol* **9**(6), 2341-9.
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- α -factor across the ER membrane. *Cell* **97**(5), 553-64.
- Matlack, K. E., Mothes, W. und Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**(3), 381-90.
- Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B. und Rapoport, T. A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes [published erratum appears in Science 1997 Sep 19;277(5333):1749]. *Science* **277**(5328), 938-41.
- Meyer, H. A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K. U. und Hartmann, E. (2000). Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* **275**(19), 14550-7.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**(Pt 1), 263-73.
- Müsch, A., Wiedmann, M. und Rapoport, T. A. (1992). Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **69**(2), 343-52.
- 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**(10), 3609-17.
- 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**(2), 269-78.
- Ng, D. T. und Walter, P. (1996). ER membrane protein complex required for nuclear fusion. *J Cell Biol* **132**(4), 499-509.
- Nguyen, T. H., Law, D. T. und Williams, D. B. (1991). Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(4), 1565-9.
- Nishiyama, K., Mizushima, S. und Tokuda, H. (1993). A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Embo J* **12**(9), 3409-15.
- Noël, P. und Cartwright, I. L. (1994). A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *Embo J* **13**(22), 5253-61.
- Özkaynak, E., Finley, D., Solomon, M. J. und Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *Embo J* **6**(5), 1429-39.
- 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**(4), 561-70.
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D. und Schekman, R. (1998). Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **9**(12), 3455-73.
- 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**(6), 795-807.
- Raleigh, E. A., Trimarchi, R. und Revel, H. (1989). Genetic and physical mapping of the *mcrA* (*rglA*) and *mcrB* (*rglB*) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **122**(2), 279-96.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B. und Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**, 271-303.

- 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**(10), 1143-50.
- Redding, K., Holcomb, C. und Fuller, R. S. (1991). Immunolocalization of Kex2p protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **113**(3), 527-38.
- Romano, J. D., Schmidt, W. K. und Michaelis, S. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* prenylcysteine carboxyl methyltransferase Ste14p is in the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **9**(8), 2231-47.
- 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**(6 Pt 1), 2641-52.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J. und Silver, P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1), 2665-75.
- Salinovich, O. und Montelaro, R. C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**(2), 341-7.
- Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D. und Schekman, R. W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* **69**(2), 353-65.
- Schatz, G. (1997). The hunt for mitochondrially synthesized proteins. *Protein Sci* **6**(3), 728-34.
- Schatz, G. und Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**(5255), 1519-26.
- 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**(11), 1145-59.
- Siegel, V. und Walter, P. (1988). Functional dissection of the signal recognition particle. *Trends Biochem Sci* **13**(8), 314-6.
- Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**(1), 19-27.
- Simon, S. M., Peskin, C. S. und Oster, G. F. (1992). What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9), 3770-4.
- Song, W., Raden, D., Mandon, E. C. und Gilmore, R. (2000). Role of Sec61 α in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. *Cell* **100**(3), 333-43.

- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9), 5187-92.
- Stirling, C. J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. und Schekman, R. (1992). Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **3**(2), 129-42.
- Swennen, D., Joyet, P. und Gaillardin, C. (1997). Cloning the *Yarrowia lipolytica* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* *SEC62* gene. *Curr Genet* **31**(2), 128-32.
- 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**(18), 12021-8.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. und Cook, W. J. (1987a). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **194**(3), 531-44.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., Wilkinson, K. D., Vierstra, R. D., Hatfield, P. M. und Cook, W. J. (1987b). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* **262**(13), 6396-9.
- Vogel, J. P., Misra, L. M. und Rose, M. D. (1990). Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol* **110**, 1885-95.
- Walter, P. und Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12), 7112-6.
- Walter, P. und Blobel, G. (1981a). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1), 557-61.
- Walter, P. und Blobel, G. (1981b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1), 551-6.
- Walter, P. und Blobel, G. (1982). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. *Oncodev Biol Med* **4**(1-2), 137-46.
- Walter, P., Ibrahimi, I. und Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1), 545-50.
- Walter, P. und Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119.
- Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P. und Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7), 3046-51.

Wilkinson, B. M., Critchley, A. J. und Stirling, C. J. (1996). Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J Biol Chem* **271**(41), 25590-7.

Wittke, S., Lewke, N., Müller, S. und Johnsson, N. (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol Biol Cell* **10**(8), 2519-30.

Wolin, S. L. (1994). From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell* **77**(6), 787-90.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. und Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**(9), 3469-78.

Wooding, S. und Pelham, H. R. (1998). The dynamics of Golgi protein traffic visualized in living yeast cells. *Mol Biol Cell* **9**(9), 2667-80.

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson für die Betreuung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt ihm für die interessante Themenstellung und die vielfältige Unterstützung während der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen danke ich für seine Bereitschaft, die Begutachtung der Arbeit zu übernehmen.

Ich möchte allen, die Material und Protokolle für die Durchführung der Experimente zur Verfügung gestellt haben, danken.

Allen meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen ein herzliches Dankeschön für zuvorkommende Hilfestellungen und die tolle Laboratmosphäre. Zuerst und vor allem geht ein großes Dankeschön an Silke Müller, die mich mit engelsgleicher Geduld in die praktischen Geheimnisse der Mikrobiologie eingewiesen hat. Darüber hinaus hat sie mit ihrer fachlichen und persönlichen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen - und wir hatten viel Spaß: danke, Madl und halt die Ohren steif! Außerdem möchte ich Nicole Lewke recht herzlich danke sagen. Die nette, schnelle und kompetente Korrektur meiner Arbeit und ihre konstruktive Kritik ist bei weitem nicht das Einzige, was ich an ihr sehr zu schätzen gelernt habe.

Marie-Theres und Dr. rer. nat. (!) Martin Hecker ermöglichten mir durch ihre liebe Bereitschaft, das Manuskript korrekturlesen, die Verwendung der neuen deutschen Rechtschreibung. Zusätzlich möchte ich erwähnen, dass ich mich in Diskussionen mit Martin, in denen es um die Wissenschaft im Allgemeinen und im Besonderen ging, stets verstanden fühlte.

Ich möchte auch vielen Freunden danken, die sich häufig geduldig meine „Laborgeschichten“ angehört haben und mir oft mit gutem Rat zur Seite standen.

Ohne die stetigen Ermutigungen von Harald, sein Verständnis, seine Ratschläge, seine ständige Bereitschaft, mir zuzuhören und natürlich das Vorlesen des Manuskriptes in der absoluten Krisensituation, wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Meinen Eltern danke ich zuletzt, aber nicht am wenigsten, dass sie mir den Weg bereitet haben, um diese Arbeit verwirklichen zu können.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|--------------|---------------|
| Name | Sandra Wittke |
| Geburtsdatum | 15.01.1973 |
| Geburtsort | Aachen |

Ausbildung

| | |
|------------|--|
| 1979-1983 | Katholische Grundschule Brühlstraße, Aachen |
| 1983- 1992 | St. Ursula Gymnasium, Aachen; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |
| 1992-1997 | Studium der Biologie (Diplom), Universität zu Köln |
| 1996-1997 | Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft/Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln unter der Laborleitung von Dr. Nils Johnsson und der Betreuung von Prof. Dr. Benno Müller-Hill; Titel der Diplomarbeit: „Untersuchung über die Wechselwirkung von Proteinen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ |
| 1997-2000 | Doktorarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft/Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln unter der Laborleitung und Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson; Titel der Dissertation: „ <i>In vivo</i> -Charakterisierung von Komponenten des Translokationsapparates des Endoplasmatischen Retikulums der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “ |

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Diagramme und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die 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 Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Priv.-Doz. Dr. Nils Johnsson betreut worden.

Teilpublikationen:

Wittke, S., Lewke, N., Müller, S., Johnsson, N. (1999). Probing the Molecular Environment of Membrane Proteins In Vivo. *Molecular Biology of the Cell* 10, 2519-30.

Wittke, S., Dünwald, M., Johnsson, N. (2000). Sec62p, a Component of the ER Protein Translocation Machinery, Contains Multiple Binding Sites for the Sec-complex. *Molecular Biology of the Cell* 11, 3859-71 .