# Zur Rolle von luminalen Proteinen und Membranproteinen des endoplasmatischen Retikulums bei der Biogenese sekretorischer Proteine

## Dissertation

zur Erlangung des Grades der Doktorin der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich - Technischen Fakultät III -Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes

von

María Díaz de Escauriaza

Saarbrücken 2006

Tag des Promotionskolloquiums:

Dekan: Vorsitzender: Berichterstatter:

Akademischer Mitarbeiter:

12. Mai 2006

Prof. Dr. K. Hegetschweiler Prof. Dr. M. Montenarh Prof. Dr. R. Zimmermann Prof. Dr. M. Schmitt Dr. G.-W. Kohring

a mis padres a Bea y Félix y a las tías a mi Oliver

## **INHALTSVERZEICHNIS**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III			
I.	EINL	EITUNG	1
I.1		Molekulare Chaperone	1
1.2		Das Hsp70/Hsp40-System	2
	I.2.1	Hsp70-Chaperone des ER	5
	1.2.2	Hsp40-Chaperone	9
1.3		Transport in das ER	11
	1.3.1	Das Translokon	12
	1.3.2	Cotranslationaler Transport	17
1.4	1.3.3		24
1.4			28
II.	MAT	ERIAL UND METHODEN	29
II.1		Material	29
	II.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
	II.1.2	Chemikalien	30
	II.1.3	Enzyme	31
	11.1.4	Antikorper	32
	11.1.5	Plasmide	32 22
	11.1.0	Oligoliukieoliue Paktorionstämmo	37
	II.1.7	Pakombinante Proteine	34
	II 1 Q	Material aus Hundenankreas	35
11 2	11.1.0	Molekularbiologische Methoden	37
	1121	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
	11.2.2	Reinigung der amplifizierten DNA mit dem "High Pure PCR Product	0.
		Purification Kit"	39
	II.2.3	Enzymatische Modifikation von Plasmid-DNA	40
	II.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	41
	II.2.5	Elution der DNA aus dem Agarosegel	42
	II.2.6	Ligation mit T4-DNA Ligase	42
	II.2.7	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	43
	II.2.8	Plasmid-DNA-Minipräparation ("Minipräp")	44
	11.2.9	Plasmid-DNA-Midipräparation ("Midipräp")	46
	II.2.1	0 Quantifizierung und Reinheitskontrolle von DNA	47
11.3		Proteinbiochemische Methoden	47
	11.3.1	Fallung von Proteinen	4/
	11.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
	11.3.3	Protoinförbung mit Coomassia Prilliant Plus	5U 51
	11.3.4	Floteiniarbung mit Coomassie-Binnant-Blue	51
	11.0.0	Immunologische Detektion von Proteinen in PVDE-Membranen	53
	11.3.7	Phosphorimaging	54
	11.3.8	Densitometrie und Image-Quant-Software	54
	11.3.9	Proteinkonzentrationsbestimmung	55
	II.3.1	0 Nachweis von biotinylierten Proteinen	56
	II.3.1	1 Analyse von Protein/Protein-Interaktionen ("pulldown"-Versuch)	57
	II.3.1	2 Konzentration von Proteinlösungen	57
II.4		Synthese und Reinigung von Fusionsproteinen	58
	II.4.1	Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	58
	II.4.2	In vitro-Synthese von Proteinen in E. coli-Lysaten: Rapid Translation	
		System 500 <i>E. coli</i> High Yield (RTS500)	60
	11.4.3	Analytische Affinitätschromatographie	62
	11.4.4	Reinigung von His <sub>6</sub> -⊢usionsproteinen in präparativem Maßstab	63
	11.4.5	Reinigung von GST-Fusionsproteinen in praparativem Maisstab	70

	II.4.6	Methoden zur Entsalzung und Umpufferung	71
II.5		Präparationen aus Hundepankreas	72
	II.5.1	Isolierung von luminalen Proteinen (RP= Retikuloplasma) aus	
		Hundepankreasmikrosomen	72
	11.5.2	Herstellung von Proteoliposomen (PL)	75
II.6		In vitro-Synthese präsekretorischer Proteine	
	II.6.1	In vitro-Transkription von mRNA mit SP6 RNA-Polymerase	
	11.6.2	In vitro-Synthese präsekretorischer Proteine	80
	11.6.3	Analyse der Art der Hemmung auf die <i>in vitro</i> - I ranslation	
11.7		I ransport von vorsturenproteinen in Hundepankreasmikrosomen oder	00
		Proteoliposomen.	
	11.7.1	Cotranslationaler Transport von In Vitro-synthetisierten Proteinen in	00
	11 7 0	Hundepankreasmikrosomen oder Proteoliposomen	83
11 0	II. <i>1</i> .Z	Pibecomonbindungoversuche: Pindung verschiedener	04
11.0		Ribosomenbindungsversuche. Bindung verschiedener	05
		Rekombinatproteine an Ribosomen	00
11.9			01
III.	ERG	EBNISSE	
.1		Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von BiP bei der	
		cotranslationalen Translokation sekretorischer Proteine in das ER-	
		Lumen	
	III.1.1	Angewendete Strategie	
	III.1.2	Avidin unterstützt den Transport von nicht biotinyliertem ppL in	
		Proteoliposomen nicht	95
	III.1.3	In Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin unterstützt den	
		Transport von biotinyliertem ppL	97
	III.1.4	In Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin unterstützt den	
		Transport von biotinyliertem ppL86mer nur wenig	100
	III.1.5	Die Biotinylierung von ppL und ppL86mer ist nicht vollständig und	
		unterschiedlich für beide Proteine	102
	III.1.6	Zusätzliches Biotin-Lysin-tRNA <sup>Lys</sup> im Translationsansatz verbessert	
		die Biotinylierung und verlangsamt die Synthese von	
		doppelmarkiertem Präprolaktin	105
	III.1.7	Der "Ratchet Mechanismus" spielt die Hauptrolle bei derStimulierung	
		des Transports von Biotin-ppL durch Avidin	107
III.2	<u>.</u>	Untersuchungen zur Funktion des Säuger-Proteins Sec62p	113
	III.2.1	Bindungsversuche von Sec62N-His <sub>6</sub> am Ribosom	113
	III.2.2	Kompetitionsversuche von Sec62N-His <sub>6</sub> , Mtj1p-C $\Delta$ C und	400
		GST-SRP14 um inre Bindungstellen am Ribosom	
	III.Z.3	Secozin-His <sub>6</sub> , Secozinaniu, Secozinas-180 und GST-Secozu in <i>In</i>	104
			134
IV.	DISK	USSION	153
IV.1	1	Über die Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von BiP bei	
		späten Schritten der cotranslationalen Translokation	153
	IV.1.1	BiP erhöht die Effizienz der Translokation durch sowohl "Ratchet" als	
		auch "Trapping" Mechanismus	154
	IV.1.2	2 Modell zur Funktion von BiP bei der cotranslationalen Translokation	
IV.2	2	Über die Untersuchungen zur Funktion des Säuger-Proteins Sec62p	164
	IV.2.1	I Sec62p interagiert mit Ribosomen	
	IV.2.2	2 Sec62p teilt die selbe Bindungsstelle mit Mtj1p am ribosomalen	
		Tunnelausgang	168
	IV.2.3	3 Sec62p moduliert die Translation	169
	IV.2.4	Effekt von Sec62p auf die cotranslationale Translokation	172
	IV.2.5	5 Modell zur Funktion von Sec62p des Säugers	173
V.	zus/	AMMENFASSUNG / SUMMARY	183
	,		407
LITE	RAIU		

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichts/Volumenprozent
Å	Angström
AA	Aminosäure, Aminosäurereste
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
ATA	Aurintricarboxylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliertes
BiP	"immunoglobulin heavy chain binding protein"
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CHI	Cycloheximid
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTP	Cytosintriphosphat
d. h.	das heißt
dest.	destilliertes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	"enhanced chemiluminescense"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-assoziierter Proteinabbau
et al.	<i>et alii</i> = und andere
FRET	"Fluorescence Resonance Energy Transfer"
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotidaustauschfaktor
Grp170	"Glucose-regulated protein 170" (kDa)
Grp78 (BiP)	"Glucose-regulated protein 78" (kDa)

Grp94	"Glucose-regulated protein 94" (kDa)
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/n
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
Hsc	Konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein
Hsp	Hitzeschockprotein
lg	Immunoglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
I	Liter
LB	Luria Bertani
Luc	Luciferase
Μ	Molar, Mol pro Liter
mA	Milliampère
hð	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute/n
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure
Mtj1p	Murine tumor cell DnaJ-like protein 1
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	"Nuclear Magnetic Resonance"
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
p.a.	per Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PK	ProteinaseK
PKRM	Puromycin- und KCI-gewaschene RM
PL	Proteoliposomen
pL	Prolaktin
plus	Präluciferase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Ponceau-S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-phenylazo]-2,7-naphtalen-disulfonsäure

ppL	Präprolaktin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pwo	Pyrococcus woesei
RM	Rauhe Mikrosomen (Hundepankreasmikrosomen)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RNC	Ribosom-naszierende Kette-Komplex
RP	Retikuloplasma (Gesamtfraktion der luminalen Proteine des Säuger-ER)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde/n
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	"Signal Recognition Particle"
SS	Signalsequenz
ТА	tailanchored (Protein)
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
ТМ	Transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	"transfer"-RNA
TX-100	TritonX-100
U	Unit, relative Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	"Unfolded Protein Response"
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Ein- und Drei-Buchstabencode für die Aminosäuren

А	Ala	Alanin	М	Met	Methionin
С	Cys	Cystein	Ν	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	Р	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
Н	His	Histidin	Т	Thr	Threonin
I	lle	Isoleucin	V	Val	Valin
Κ	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## I. EINLEITUNG

Die Komponenten einer eukaryontischen Zelle sind in membranumschlossenen Kompartimenten organisiert. Die charakteristische Protein- und Lipid-Zusammensetzung jeder dieser Organellen wie z. B. Zellkern, endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Mitochondrien oder Peroxisomen bestimmt eine spezialisierte Umgebung, in der unterschiedliche Stoffwechselwege effektiv und ohne gegenseitige Beeinflussung stattfinden können. Da die meisten Proteine durch Ribosomen im Cytosol synthetisiert werden, ihre Funktion aber an anderen Orten in der Zelle oder im Fall der sekretorischen Proteine außerhalb der Zelle ausüben, müssen sie dafür zum Bestimmungsort transportiert werden. Dieses erfordert unter Umständen den Transport durch Membranbarrieren, wofür komplexe Translokationssysteme benötigt werden.

Sekretorische Proteine, Proteine des ER und des Golgi-Apparates, viele Plasmamembranproteine sowie einige Proteine anderer Organellen werden während (cotranslational) oder nach Beendigung ihrer Synthese (posttranslational) in das ER, den Ausgangspunkt des sekretorischen Weges, transportiert (Membranproteine werden in die Membran inseriert). Das ER stellt in sekretorischen Zellen mehr als 50 % der Membranfraktion dar und ist somit eines der größten Organellen der eukaryontischen Zelle (Chevet et al., 2001). Im ER-Lumen können die Proteine posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung und Disulfidbrückenbildung) erhalten. Hier werden sie auch korrekt gefaltet und assembliert. Proteine, die ihre native Konformation nicht erreichen, werden von der Qualitätskontroll-Maschinerie erkannt und durch retrograden Transport ins Cytosol exportiert, wo sie anschließend degradiert werden. Alle diese Prozesse werden nur durch die Beteiligung von molekularen Chaperonen effizient durchgeführt. Nachdem die Proteine ihre native Konformation erreicht haben, kann ihr weiterer Transport zum Golgi-Apparat, wo zusätzliche Modifikationen stattfinden, und anschließend zu ihrem letztendlichen Ziel erfolgen.

## I.1 Molekulare Chaperone

Diese ubiquitär verbreitete Klasse von Proteinen wurde zunächst als stressinduzierbar klassifiziert, obwohl Chaperone auch unter normalen Wachstumsbedingungen essentielle Funktionen ausüben (Craig, 1985; Lindquist, 1986; Georgopoulos *et*  *al.*, 1989; Frydman und Hartl, 1994; Gething *et al.*, 1994). Molekulare Chaperone werden heute als Proteine definiert, die ansonsten instabile Konformere anderer Proteine binden und diese stabilisieren (Hendrick und Hartl, 1993). Durch kontrollierte Bindung und Freisetzung ermöglichen Chaperone die Faltung oder Oligomerisierung, aber auch den Transport ihrer Substrate in ein bestimmtes subzelluläres Kompartiment (Hendrick und Hartl, 1993).

Der Großteil der bereits identifizierten Chaperone gehört zu den Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Lektin Proteinfamilien. Auch Faltungsenzyme der Proteindisulfidisomerase- und Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Familie agieren als molekulare Chaperone. Alle erwähnten Proteinfamilien, mit Ausnahme der Hsp60-Chaperone, sind im ER vertreten. Im ER wurde auch kürzlich die Shr3-Familie, eine Substrat-spezifische Chaperon-Klasse, entdeckt (Kota und Ljungdahl, 2005). Die Mitglieder der Hsp70- und Hsp40-Familien haben wichtige Funktionen bei der Proteinbiogenese.

#### I.2 Das Hsp70/Hsp40-System

Molekulare Chaperone der Hsp70- und Hsp40-Familien arbeiten zusammen an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Proteinfaltung, Translokation durch Membranen, Assemblierung und Disassemblierung oligomerer Proteinstrukturen, Abbau instabiler oder fehlgefalteter Proteine sowie Regulierung der Aktivität von Signalmolekülen. Sie wurden in Prokaryonten und in den meisten Kompartimenten eukaryontischer Zellen identifiziert (Morimoto *et al.*, 1994; Hartl, 1996).

Die Stress-induzierbaren 70-kDa <u>H</u>itze-<u>S</u>chock-<u>P</u>roteine sind hoch konservierte ATPasen (Flaherty *et al.*, 1990). Sie weisen eine mindestens 50 %ige Homologie zueinander auf (Boorstein *et al.*, 1993) und besitzen eine typische Domänenstruktur: eine hoch konservierte N-terminale ATPase-Domäne von ca. 45 kDa (Chappell *et al.*, 1987; Flaherty *et al.*, 1990), eine C-terminale Domäne, die die Substratbindungsdomäne von 18 kDa und eine 10 kDa große C-terminale Unterdomäne enthält (Wang *et al.*, 1993; Rüdiger *et al.*, 1997). Struktur-Analysen der Substratbindungsdomäne zeigen, dass die Peptide an eine Tasche aus  $\beta$ -Faltblattmotiven binden, die von einer flexiblen  $\alpha$ -helikalen Klappe geöffnet oder verschlossen wird (Morshauser *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1996). Hsp70-Chaperone binden ungefaltete oder partiell gefaltete Polypeptidketten und verhindern dabei deren Aggregation und assistieren bei deren Faltung (Hartl,

#### I. Einleitung

1996). Diese Fähigkeit resultiert aus ihrer Grundfunktion, hydrophobe Segmente einer ungefalteten Polypeptidkette in einem ATP-hydrolysierenden Reaktionszyklus zu binden und wieder freizusetzen (Flynn *et al.*, 1991). In der ATP-gebundenen Form schwenkt die α-helikale Klappe, um die Bindungstasche zu exponieren, so dass die Substrate schnell binden und wieder dissoziieren können. ATP-Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung, bei der die helikale Klappe die Bindungstasche wieder verschließt, so dass das Substrat stabil gebunden wird (Palleros *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1994). Durch das Austauschen des ADP gegen ATP wird das Substrat wieder freigesetzt (Schmid *et al.*, 1994; McCarty *et al.*, 1995). Die Substrate werden bis zum Erreichen der korrekten Konformation mehrmals gebunden und freigesetzt (Szabo *et al.*, 1994; Buchberger *et al.*, 1996). Dieser Bindungs-/Freisetzungszyklus wird durch Proteine der Hsp40-Familie sowie durch Nukleotidaustauschfaktoren und andere Cofaktoren moduliert.

Proteine der GrpE-Familie katalysieren durch Interaktion mit der ATPase-Domäne den Nukleotidaustausch von Hsp70-Chaperonen in Prokaryonten und in Mitochondrien und Chloroplasten (Liberek et al., 1991; Dekker und Pfanner, 1997; Miao et al., 1997). Eine GrpE-ähnliche Funktion haben die Säuger-Proteine BAP (BiPassoziiertes Protein) (Chung et al., 2002) und Grp170 (Hsp70-Chaperon) (Andreas Weitzmann, eingereicht) und die dazu entsprechende homologen Proteine in der Hefe, SIs1p/Sil1 (Boisramé et al., 1996; Boisramé et al., 1998; Kabani et al., 2000; Tyson und Stirling, 2000) und Lhs1p (Steel et al., 2004), die im ER-Lumen als Nukleotidaustauschfaktor des Haupt-Hsp70-Chaperons BiP (Kar2p in Hefe) dienen. Auch im Cytosol wurde ein zu Sls1p/Sil1p homologes Protein, HspBP1p (Fes1p in Hefe) identifiziert, das den Nukleotidaustausch seiner cytosolischen Hsp70-Partner katalysiert (Kabani et al., 2002a; Kabani et al., 2002b). Im Cytosol eukaryontischer Zellen wird der Nukleotidstatus von Hsp70-Molkülen darüber hinaus durch andere Proteine reguliert. So stabilisiert das Protein Hip die ADP-gebundene Form von Hsp70 (Höhfeld et al., 1995; Frydman und Höhfeld, 1997; Liu et al., 1999) und die Proteine Hop/p60/Sti1p (Smith et al., 1993; Carrigan et al., 2004) und Bag-1/RAP46 (Frydman und Höhfeld, 1997; Höhfeld und Jentsch, 1997) stimulieren den Nukleotidaustausch. Das Hsp40-Homologe Ydj1p scheint neben der Regulierung der ATPase-Aktivität seines Hsp70-Partners Ssa1p im Cytosol der Hefe auch für den Nukleotidaustausch verantwortlich zu sein (Ziegelhoffer et al., 1995) (siehe I.3.3).

Die Mitglieder der Hsp40-Familie, auch DnaJ-Familie genannt, sind durch den Besitz einer ca. 70 AA-langen, meist N-terminalen Sequenz charakterisiert, die als J-Domäne bezeichnet wird. Hsp40-Proteine agieren als Cochaperone der Hsp70-Proteine. Sie interagieren ATP-abhängig und transient mit Hsp70-Chaperonen und stimulieren dadurch deren schwache intrinsische ATPase-Aktivität (Bukau und Horwich, 1998; Misselwitz et al., 1999). Für die Interaktion und Stimulierung ist die J-Domäne und darin ein konserviertes Aminosäure-Triplet (His-Pro-Asp, HPD-Motiv) notwendig (Kassenbrock und Kelly, 1989; Silver und Way, 1993; Schmid et al., 1994; Szyperski et al., 1994; Wall et al., 1994; Hill et al., 1995; Tsai und Douglas, 1996). Weitere Regionen der Hsp40-Chaperone können auch mit einer Stelle neben oder an der Substratbindungsdomäne von Hsp70-Proteinen interagieren (Gässler et al., 1998; Suh et al., 1998; Suh et al., 1999; Hennessy et al., 2005). Die maximale Stimulation der ATPase-Aktivität wird in der Gegenwart eines Bindungssubstrats erreicht (Karzai und McMacken, 1996). Hsp40-Homologe werden aufgrund ihrer strukturellen Ahnlichkeit zum archetypischen E. coli-Chaperon DnaJ in drei Klassen eingeteilt. Typ I-Homologe weisen die höchste Homologie auf. Nach der J-Domäne folgt eine Glycin/Phenylalanin-reiche Region, (Wall et al., 1995; Karzai und McMacken, 1996; Szabo et al., 1996) und eine Cystein-reiche Zentraldomäne mit einem Zinkfinger-Motiv, die eine Peptidbindungstasche darstellt (Banecki et al., 1996; Szabo et al., 1996). Typ II-Vertretern fehlt die Cystein-reiche Domäne, sie können aber durch eine C-terminale Region direkt mit nicht gefalteten Substraten interagieren (Lu und Cyr, 1998). So können Typ I und Typ II Hsp40-Chaperone auch selbst Peptidketten binden und diese vor Aggregation schützen oder als Substrat zu einem Hsp70-Molekül transferieren (Laufen et al., 1999; Johnson und Craig, 2001; Rüdiger et al., 2001). Typ III-Homologe besitzen nur die J-Domäne (Cheetham und Caplan, 1998). Welche spezifische Rolle wie z.B. Proteinfaltung oder Translokation durch Membranen Hsp70-Chaperone ausüben, wird von ihrem Hsp40-Partner bestimmt (Rassow et al., 1995; McClellan et al., 1998). Denn obwohl Hsp40-Homologe eine gewisse Selektivität für ihre Hsp70-Partner zeigen (Schlenstedt et al., 1995; McClellan et al., 1998), sind sowohl Hsp70- als auch Hsp40-Chaperone in der Lage, mit mehreren Vertretern der jeweiligen Familien zu interagieren.

#### I.2.1 Hsp70-Chaperone des ER

Im ER-Lumen sind Hsp70-Chaperone durch **BiP**/Grp78 und **Grp170** im Säuger, und **Kar2p** und **Lhs1p**, deren jeweilige Homologe in der Hefe, vertreten (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989).

#### I.2.1.1 BiP

BiP wurde als "immunoglobulin heavy chain <u>binding protein</u>" (BiP) und als "glucose <u>regulated protein 78 kDa</u>" (Grp78) identifiziert (Pouyssegur *et al.*, 1977; Haas und Wabl, 1983; Munro und Pelham, 1986; Hendershot *et al.*, 1988). Seine Synthese und die seines Homologes in der Hefe, Kar2p, wird durch die "unfolded protein response" (UPR) hochreguliert. Die UPR ist ein Schutz-Mechanismus eukaryontischer Zellen, der bei Situationen, die zur Anhäufung ungefalteter Proteinen im ER führen, aktiviert wird. Bei der UPR wird die Synthese eines spezifischen Sets von Proteinen induziert, das der Stress-Situation entgegen wirkt (Pouyssegur *et al.*, 1977; Chen *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996; Saris *et al.*, 1997). Die Synthese von BiP wird auch auf posttranskriptionalem Niveau reguliert. Diese Regulation und die durch die UPR vermittelte Induktion sind unabhängige Mechanismen (Gulow *et al.*, 2002). BiP/Grp78 besitz die charakteristische Struktur eines Hsp70-Chaperons und wird entsprechend reguliert (Bukau und Horwich, 1998; Gething, 1999), dabei agieren BAP (SIs1p in Hefe) (Chung *et al.*, 2002) und Grp170 (Andreas Weitzmann, eingereicht) als Nukleotidaustauschfaktor für BiP (siehe I.2 und I.2.1.2).

Sowohl im Säuger als auch in der Hefe ist BiP bzw.Kar2p an mehreren Prozessen beteiligt. Das Protein spielt eine wesentliche Rolle bei mehreren Schritten während der Translokation von Vorstufenproteinen bzw. der Insertion von Membranproteinen durch bzw. in die ER-Membran. Dies wird detailliert unter I.3 beschrieben. Während dieser Prozesse muss die Difussion von Ionen bzw. kleinen Molekülen durch die Translokationspore verhindert werden. Verschiedene *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass BiP eine Rolle bei der Permeabilitätserhaltung spielt, denn es versiegelt die luminale Seite des Translokationskanals sowohl bei inaktiven Translokons als auch bei aktiven in frühen Stadien der Translokation und während der Insertion eines Membranproteins (Hamman *et al.*, 1998; Haigh und Johnson, 2002; Wirth *et al.*, 2003) (siehe I.3.2). Der Mechanismus, bei dem BiP

diese Funktion ausübt, ist analog zu der Bindung und Freisetzung von Substraten. So erfordert die Versiegelung der Pore die ADP-gebundene Form von BiP sowie funktionelle Interaktionen seiner Substratsbindungsdomäne und J-Interaktionsdomäne mit dem Translokon oder an dieses assoziierten Proteinen. Das Wiederöffnen des Translokons erfordert die ATP-gebundene Form von BiP (Alder *et al.*, 2005).

Bevor ein Protein das ER verlassen und dem weiteren sekretorischen Weg folgen kann, muss es zu seiner nativen Konformation gefaltet werden. Das ER besitzt eine Qualitätskontroll-Maschinerie, die Proteine in einer nicht-nativen Konformation erkennt und entweder faltet oder ins Cytosol zurücktransportiert, wo sie durch das Proteasom abgebaut werden. Dieser ER-assoziierte Proteinabbau, ERAD (ER-associated protein degradation) genannt, gehört auch zum Qualitätskontroll-System und dient der Entlastung des ER von dauerhaft fehlgefalteten Proteinen. Neben Proteinen der Hsp90- (Muresan und Arvan, 1997; Randow und Seed, 2001), Lektin- (de Virgilio et al., 1999; Wilson et al., 2000; Helenius und Aebi, 2001) und Proteindisulfidisomerase-Familie (McLaughlin und Bulleid, 1998; Gillece et al., 1999; High et al., 2000; Norgaard et al., 2001; Tsai et al., 2001) ist auch BiP Teil dieser Qualitätskontroll-Maschinerie. BiP bindet durch seine Peptidbindungsdomäne in vitro Peptide, die das heptamere Motiv Hy-(W/X)-Hy-X-Hy-X-Hy enthalten, wobei Hy ein hydrophober und X ein beliebiger Aminosäurerest ist. Diese Motive sind in der Regel in nativen Proteinen nicht exponiert (Flynn et al., 1991; Blond-Elguindi et al., 1993a; Fewell et al., 2001). Dies lässt, zusammen mit der Beobachtung, dass BiP transient mit Faltungsintermediaten und stabiler mit fehlgefalteten Proteinen assoziiert (Haas und Wabl, 1983; Kassenbrock et al., 1988; Hurtley et al., 1989; Sikorski und Hieter, 1989; Machamer et al., 1990; Blount und Merlie, 1991; Knittler und Haas, 1992; Knittler et al., 1995; Simons et al., 1995; Tyedmers, 2001), den Schluss zu, dass es an der Faltung und Assemblierung neusynthetisierter Proteine und an der Retention fehlgefalteter Proteine beteiligt ist (Hegde et al., 1998; Gething, 1999). Dabei wird die Interaktion von BiP mit potentiellen Bindungstellen in dem Protein von der Geschwindigkeit der Faltung und Stabilität der Faltungsintermediate bestimmt. So bindet BiP bevorzugt Proteine, die langsam oder instabil falten (Hellman et al., 1999). Das Hefe Homologe Kar2p ist wie BiP an der Proteinfaltung beteiligt (Normington et al., 1989; Rose et al., 1989; Simons et al., 1995) (siehe I.2.1.2). BiP wird auch für den Abbau von ERAD-Substraten benötigt. Sowohl im Säuger (Knittler et al., 1995; Beggah et al., 1996; Chillaron und Haas, 2000; Jin et al., 2000) als auch in der Hefe (Plemper et al., 1997; Brodsky et al., 1999) wurde eine Beteiligung von BiP/Kar2p beim Abbau von ERAD-Substrate beschrieben. Dies geschieht im Säuger wahrscheinlich in Kooperation mit ERj3p (Shen und

Hendershot, 2005) und in der Hefe mit dessen Homologen Scj1p und Jem1p (Nishikawa et al., 2001), die Hsp40-Chaperone darstellen. Die Funktion von BiP/Kar2p bei der Retrotranslokation ist noch nicht klar. Sie könnte darin liegen, das Substrat in einem exportkompetenten Zustand zu halten (Nishikawa et al., 2001; Winkeler et al., 2003). BiP könnte außerdem als Zeitschalter fungieren, bei dem die Substrate erst nach ihrer ATP-abhängigen Freisetzung von BiP für Faktoren erreichbar werden, die ihre Retrotranslokation vermitteln würden (Winkeler et al., 2003). Eine weitere Vermutung ist, dass BiP an der Öffnung der Translokationspore vor der Retrotranslokation beteiligt ist (Brodsky und McCracken, 1999). BiP (Winkeler et al., 2003) bzw. Kar2p (Eisfeld et al., 2000) nehmen auch am retrograden Transport einiger Toxine teil, die diesen Weg nutzen, um vom ER ins Cytosol zu gelangen (Simpson et al., 1999; Eisfeld et al., 2000; Schmitz et al., 2000). Fehlgefaltete cytosolische Domänen in Transmembranproteinen werden nicht von BiP/Kar2p, sondern von cytosolischen Chaperonen der Hsp70und Hsp90 Familie erkannt (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001). Aufgrund seiner Funktionen bei der ER-Qualitätskontrolle wird BiP durch die UPR hochreguliert, aber es ist selber Teil eines ER-Stress-Sensor-Systems, das zur UPR-Aktivierung führt (Morris et al., 1997; Leborgne-Castel et al., 1999). Unter normalen Wachstumsbedingungen liegt BiP assoziiert mit den UPR-Schlüsselkomponenten Ire1p, PERK und ATF6 vor, deren Aktivierung zur UPR-Induktion führt. Unter Bedingungen, die zur UPR-Induktion führen löst sich BiP jedoch von diesen ab. So wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem die Bindung von BiP unter normalen Wachstumsbedingungen sowohl die Dimerisierung von Ire1p und PERK, die deren Aktivierung zur Folge hat, verhindert als auch die Retention von ATF6 im ER-Lumen, welches im Golgi-Komplex durch Proteolyse aktiviert wird, zur Folge hat. Erst bei einem höheren Bedarf an BiP durch Anhäufung ungefalteter Proteine im ER würde BiP von diesen Signal-Molekülen dissoziieren, deren Aktivierung erlauben und somit zur letztendlichen UPR-Aktivierung führen (Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000; Shen et al., 2002a; Kimata et al., 2003; Rutkowski und Kaufman, 2004). Spätere Mutations-Versuche zeigen jedoch für Ire1p, dass BiP nicht der Hauptinduktor seiner Aktivität, sondern eher ein Modulator seiner Sensitivität gegenüber verschiedenen Stresssituationen darstellt (Kimata et al., 2004).

Eine weitere Funktion von BiP ist die Calcium-Speicherung im ER-Lumen (Gething, 1999). Die Beteiligung von BiP an der Calcium-Speicherung wurde unter normalen physiologischen Bedingungen als ~ 25 % berechnet und ist auf dessen

Fähigkeit, Calcium zu binden, und nicht auf dessen Funktion als Chaperon eines anderes Proteins zurückzuführen (Lievremont *et al.*, 1997).

In der Hefe spielt Kar2p darüber hinaus eine Rolle beim zweiten Schritt der Karyogamie, der Verschmelzung der beiden Kernmembranen (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989; Latterich und Schekman, 1994). Als sein Hsp40-Interaktionspartner wird Jem1p vorgeschlagen (Ng und Walter, 1996; Nishikawa und Endo, 1997; Brizzio *et al.*, 1999) (siehe I.2.2). Die auch an dem Translokationsprozess beteiligten Proteine Sec63p (ein Hsp40-Chaperon das mit Kar2p interagiert) sowie Sec71p und Sec72p, die mit Sec63p assoziieren, sind an diesem Schritt der Karyogamie beteiligt (Ng und Walter, 1996; Brizzio *et al.*, 1999) (siehe I.3.1).

#### I.2.1.2 Grp170

Das zweite Hsp70-Chaperon im ER des Säugers ist das lösliche Glykoprotein Grp170/Orp150 (Lin et al., 1993; Ikeda et al., 1997). Grp170 und sein homologes Protein in Hefe Lhs1p/Cer1p/Ssi1p (Baxter et al., 1996; Craven et al., 1996; Hamilton und Flynn, 1996) Werden bei der UPR hochreguliert (Chen et al., 1996; Saris et al., 1997). Als Hsp70-Chaperon enthält Grp170 eine N-terminale ATPase-Domäne, während sein C-Terminus der Hsp110/Sse-Unterfamilie der Hsp70-Chaperone ähnelt. So stellt es den einzigen Vertreter einer neuen Hsp70-Unterfamilie im ER dar (Chen et al., 1996). Grp170 bzw. Lhs1p ist für einen effizienten Proteintransport in das ER notwendig (Baxter et al., 1996; Craven et al., 1996; Dierks et al., 1996; Hamilton und Flynn, 1996; Tyson und Stirling, 2000). Es spielt auch eine Rolle bei der Proteinfaltung. In vitro Versuche mit Deletionsmutanten haben gezeigt, dass der C-Terminus zwei unabhängige Substratbindungsdomänen enthält, wodurch Grp170, sowie Lhs1p, mit hitzedenaturierten Substraten interagiert, deren Aggregation verhindert und ihre Rückfaltung ermöglicht (Hamilton et al., 1996; Saris et al., 1997; Park et al., 2003). Bei seiner Interaktion mit fehlgefalteten Proteinen und nicht assemblierten Immunglobulinen wurde Grp170 in Assoziation mit BiP, dem Hsp90-Chaperon Grp94 und dem Faltungsenzym ERp72 isoliert (Lin et al., 1993; Kuznetsov et al., 1997; Schmidt und Perlmutter, 2005). Grp170 bzw. Lhs1p und BiP bzw. Kar2p üben ihre Funktion in koordinierter Form aus. Dabei funktioniert Grp170/Lhs1p als Nukleotidaustauschfaktor für BiP/Kar2p und BiP/Kar2p stimuliert dann in der ADP-Form (anstelle von Hsp40-Chaperonen) die Grp170/Lhs1p-ATPase-Aktivität (Steel et al., 2004; Andreas Weitzmann, eingereicht). Die

Kopplung dieser zwei ATPase-Aktivitäten ist essentiell für eine normale Zellfunktion (Steel *et al.*, 2004). Durch diesen koordinierten Mechanismus können beide Chaperone verschiedene Regionen desselben Substrats binden und die Effizienz von dessen Faltung zur nativen Konformation erhöhen (Steel *et al.*, 2004).

#### I.2.2 Hsp40-Chaperone

Im ER des Säugers wurden bisher fünf Hsp40-Homologe identifiziert.

Das membranständige **Sec63p**/ERj2 ist ein Typ III Hsp40-Chaperon. Es stellt das Säuger-Homologe des Sec63p der Hefe dar und spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Proteintransport ins ER (Skowronek *et al.*, 1999; Tyedmers *et al.*, 2000) (siehe I.3.1). In der Hefe stellt Sec63p eine essentielle integrale Komponente des Translokationsapparates dar, der den posttranslationalen Transport von Proteinen durch oder die Insertion in die ER-Membran gewährleistet (Rothblatt *et al.*, 1989; Sadler *et al.*, 1989; Deshaies *et al.*, 1991; Feldheim *et al.*, 1992; Panzner *et al.*, 1995). Dafür ist seine ATP-abhängige Interaktion mit Kar2p, seinem Hsp70-Partner, notwendig (Brodsky und Schekman, 1993; Lyman und Schekman, 1995) (siehe I.3.3). Eine Beteiligung beider Proteine wurde ebenfalls für den cotranslationalen Proteintransport (siehe I.3.2) (Brodsky *et al.*, 1995; Boisramé *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001) sowie für den retrograden Transport von Proteinen aus dem ER ins Cytosol beschrieben (Plemper *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999).

Das Membranprotein **Mtj1p**/ERj1p/Htj1p wurde als <u>"m</u>urine <u>t</u>umor cell Dna<u>J</u>-like protein <u>1</u>" (Mtj1p) identifiziert (Brightman *et al.*, 1995). Es enthält eine N-terminale, luminal lokalisierte J-Domäne, eine Transmembrandomäne und eine große (AA 169-552) cytosolische Domäne, innerhalb derer ein Bereich mit Homologie zu Sec63p liegt (Chevalier *et al.*, 2000; Dudek, 2002). Mtj1p interagiert als Hsp40-Cochaperon mit dem Hsp70-Chaperon BiP (Chevalier *et al.*, 2000; Dudek, 2002) (siehe I.2). Die cytosolische Domäne von Mtj1p interagiert mit Ribosomen und kann dadurch die Initiation der Translation hemmen. Ein hoch geladenes, basisches Nonapeptid N-terminal dieser Domäne ist notwendig und ausreichend, um diese Interaktion bzw. diesen Effekt zu vermitteln (Dudek *et al.*, 2005). Es wurde vorgeschlagen, dass Mtj1p auf diese Weise die transmembranäre Rekrutierung von Hsp70-Chaperonen zu Ribosomen sowie möglicherweise die Signal-Transduktion zwischen Ribosomen und Hsp70-Chaperonen vermittelt (Dudek, 2002). Darüber hinaus wird vorgeschlagen, dass Mtj1p als membranständiger Transkriptionsfaktor fungiert, der durch Proteolyse innerhalb der Membran aktiviert wird (Zupicich *et al.*, 2001; Dudek *et al.*, 2005). Mtj1p wurde auch gemeinsam mit BiP in der Plasmamembran gefunden, daraufhin wurde eine weitere Rolle für Mtj1p bei der Translokation von BiP zur Plasmamembran vorgeschlagen (Misra *et al.*, 2005). Durch seinen inhibitorischen Effekt auf α1-Antichymotrypsin wird eine Rolle für Mtj1p/Htj1p/ERj1p bei der Sekretion von Protease-Inhibitoren vorgeschlagen (Kroczynska *et al.*, 2004)

Das luminale Typ I-Hsp40-Chaperon **ERj3**/HEDJ/ABBP-2 ist das Säuger-Homologe des Hefe-Proteins Scj1p (Bies *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2001). ERj3p stimuliert wie Scj1p durch seine J-Domäne die ATPase-Aktivität von BiP (Kar2p in Hefe) (Schlenstedt *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2000; Bies *et al.*, 2004; Shen und Hendershot, 2005). Es bindet neu synthetisierte, ungefaltete Proteine und ERAD-Substrate und transferiert diese zu BiP, was auf eine Rolle bei der Qualitätskontrolle hindeutet (Meunier *et al.*, 2002; Shen und Hendershot, 2005). Auch Scj1p ist zusammen mit Kar2p an der Qualitätskontrolle in der Hefe beteiligt (Nishikawa und Endo, 1997; Silberstein *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 2001).

Das Typ II DnaJ-Chaperon **ERj4p** ist über seine Signalsequenz an der Membran verankert (Shen *et al.*, 2002b) und das lösliche **ERj5**/JPDI enthält eine Thioredoxinähnliche Domäne und gehört somit auch zur Proteindisulfidisomerase-Familie (Faltungsenzyme (Ferrari und Söling, 1999; Tu und Weissman, 2004; Ellgaard und Ruddock, 2005)). Beide assoziieren durch die J-Domäne mit BiP und stimulieren seine ATPase-Aktivität (Shen *et al.*, 2002b; Cunnea *et al.*, 2003). Ihre ausgeprägte Expression in sekretorischen Geweben und die Induktion ihrer Transkription bei ER-Stress lassen eine Rolle bei der Proteinfaltung und/oder ERAD im Zusammenspiel mit BiP vermuten (Shen *et al.*, 2002b; Cunnea *et al.*, 2003; Hosoda *et al.*, 2003).

Weitere Hsp40-Chaperone der Hefe sind das nicht essentielle Membranprotein **Jem1p**, das durch Interaktion seiner J-Domäne mit Kar2p eine Rolle bei der Karyogamie und bei der Retrotranslokation von ERAD-Substraten spielt (Ng und Walter, 1996; Nishikawa und Endo, 1997; Nishikawa *et al.*, 2001) und **Scj2p**, ebenfalls ein Membranprotein mit der J-Domäne luminal lokalisiert über dessen Funktion jedoch noch nichts bekannt ist (Eki *et al.*, 1996).

### I.3 Transport in das ER

Proteine des ER oder für den sekretorischen Weg bestimmte Proteine enthalten eine sogenannte Signalsequenz (SS), eine in der Regel N-terminale und meist abspaltbare Extension (13-36 AA) der naszierenden Polypeptidkette, die dafür sorgt, dass die Proteine für ihren Transport an die cytosolische Seite der ER-Membran geleitet werden (von Heijne, 1985). Den bekannten SS konnte keine Konsensus-Sequenz zugeordnet werden (von Heijne, 1986). Die Spezifizität ergibt sich jedoch durch Übereinstimmungen in der Sekundärstruktur und bestimmten Eigenschaften. Das wesentliche Element der SS liegt in ihrer hydrophoben zentralen Region von etwa 6-10 AA, die N-terminal von einer polaren, meist positiv geladenen Region und C-terminal von einer Region aus oft ungeladenen polaren Aminosäuren flankiert wird. Die C-terminale Region enthält eine Spaltstelle für die Signalpeptidase, die durch zwei kurzkettige, ungeladene AA in Position -3 und -1 festgelegt wird (Perlman und Halvorson, 1983; von Heijne, 1985). Bei der Integration von Membranproteinen in die ER-Membran gibt es prinzipiell zwei Arten von Targeting-Signalen. Zum einen gibt es Membranproteine, die N-terminale, spaltbare SS besitzen. Daneben gibt es Klassen von Membranproteinen, die so genannte Signalankersequenzen besitzen. Diese werden nach dem Targeting zur ER-Membran nicht abgespalten und dienen als Anker des Proteins in der Membran (High und Laird, 1997). Signalankersequenzen können N-terminal (Signalanchored-Proteine) oder C-terminal (tailanchored-Proteine) lokalisiert sein (Whitley et al., 1996; High und Laird, 1997).

Naszierende Polypeptidketten können während ihrer Synthese (cotranslational) oder nach deren Abschluss (posttranslational) zum ER geleitet und anschließend ins ER transportiert werden. Bei beiden Mechanismen müssen die naszierenden bzw. neusynthetisierten Polypeptide in einem transportkompetenten Zustand bis zum Beginn der Translokation durch die ER-Membran gehalten werden, denn Vorläuferproteine mit nativ gefalteten Domänen sind nicht in der Lage, die Translokationspore zu durchqueren (Chirico *et al.*, 1988; Eilers und Schatz, 1988; Verner und Schatz, 1988; Zimmermann *et al.*, 1988). Der Translokationsprozess für den co- und posttranslationalen Transport umfasst mehrere Phasen: die spezifische Assoziation des Vorläufers mit der ER-Membran (Targeting), den Übergang in die Translokationspore (Insertion) und das Durchqueren der Pore bis zum vollständigen Gelangen ins ER-Lumen (Elongation bzw. Termination).

#### I.3.1 Das Translokon

Die co- und posttranslationalen Transportwege treffen auf der Höhe der ER-Membran, beim Translokationskanal (Translokon), und darin beim Sec61-Komplex, dessen Hauptbestandteil, ein. Die ursprüngliche Hypothese von Blobel und Dobberstein (1975b), dass sekretorische Proteine die ER-Membran durch wässrige aus integralen Membranproteinen gebildete Poren durchqueren, wurde durch verschiedene Untersuchungen bestätigt und die Komponenten des Translokons identifiziert (Deshaies und Schekman, 1987; Krieg *et al.*, 1989b; Wiedmann *et al.*, 1989; High *et al.*, 1991b; Simon und Blobel, 1991; Thrift *et al.*, 1991; Stirling *et al.*, 1992; Görlich und Rapoport, 1993; Crowley *et al.*, 1994; Hanein *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 2003). Auf dieser Basis wird heute akzeptiert, dass die Hauptkomponente des Translokons, der heterotrimere Sec61-Komplex, aus den ER-Membranproteinen Sec61α (Sec61p in Hefe), Sec61β (Sbh1p in Hefe) und Sec61γ (Sss1p in Hefe) gebildet wird (Görlich und Rapoport, 1993).

Obwohl im Säuger posttranslationale Translokation beschrieben worden ist (Connolly und Gilmore, 1986; Perara *et al.*, 1986; Müller und Zimmermann, 1987; Schlenstedt und Zimmermann, 1987), erfolgt der Proteintransport in das ER fast ausschließlich cotranslational. Hier sind der Sec61-Komplex und TRAMp (<u>tr</u>anslocating chain-<u>a</u>ssociated <u>m</u>embrane <u>p</u>rotein) die Kern-Komponenten des Translokons, denn sie sind notwendig und ausreichend, um den cotranslationalen Transport zu rekonstituieren (Görlich und Rapoport, 1993; Oliver *et al.*, 1995; Voigt *et al.*, 1996). TRAMp ist in einem frühen Stadium der Transloka-tion an dem Transport einer Reihe sekretorischer Proteine beteiligt (Wiedmann *et al.*, 1987; Krieg *et al.*, 1989a; Görlich *et al.*, 1992a; Görlich und Rapoport, 1993).

Hochauflösende Kryo-EM-Aufnahmen kombiniert mit Röntgen-Strukturen des SecYEG-Komplexes (der prokaryontischen Homolog des Sec61-Komplexes) zeigen, dass der Kern des prokaryontischen Translokons aus zwei in einer Ringstruktur angeordneten Sec YEG-Komplexen besteht (Mitra *et al.*, 2005). Kryo-EM-Analysen des eukaryontischen Translokons zeigen für den Sec61-Komplex ähnliche ringförmige Strukturen, aber es wird diskutiert, ob diese aus zwei oder vier Sec61-Komplexen bestehen (Ménétret *et al.*, 2000; Beckmann *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2002; Menetret *et al.*, 2005). Die meisten Sec61-Komplexe befinden sich bei aktivem Metabolismus in diesem Zustand (Snapp *et al.*, 2004), welcher durch eine Assoziation mit Ribosomen induziert werden kann (Hanein *et al.*, 1996). Die Innenwände der Translokationspore werden von den TM-Domänen der α-Untereinheit gebildet (Görlich *et al.*, 1992; Müsch *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992; High *et al.*, 1993; Joly und Wickner, 1993; Mothes *et al.*, 1994), aber es ist unklar, wie die α-Untereinheiten der Sec61-Komplexe an der Bildung der Innenpore beteiligt sind. Die Röntgenstruktur des SecYEG-Komplexes zeigt, dass die TM-Domänen von SecY, die α-Untereinheit, die Membran durchspannen und einen sanduhrformigen Kanal bilden. Die zentrale Einengung der "Sanduhr" wird von der Außenseite durch einen beweglichen TM-Segment geschlossen (van den Berg et al., 2004). Es wird vorgeschlagen, dass die Interaktion der SS die Verschiebung dieses Segments bewirkt, was zur Öffnung des Kanals führt, und dass während des Transports die Kanäle in den Sec61-Komplexen des Translokons in einer große Pore sich vereinigen (Driessen, 2005). In Übereinstimmung damit zeigen Rekonstitutionsuntersuchungen mit Fluoreszenzquenching und Elektrophysiologische Analysen eine hoch dynamische Translokationspore, deren Durchmesser vom inaktiven zum aktiven Zustand variiert (Hamman et al., 1997; Hamman et al., 1998; Wirth et al., 2003). Die Elektrophysiologische Analysen mit nativen und rekonstituierten Membranen zeigen unter co- und posttranslationalen Bedingungen Porendurchmesser von 6 Å bis 60 Å (vollständig geöffnete Pore) mit einem häufigen und stabileren teilweise-geöffneten Zustand von 20 Å (Wirth et al., 2003). Translokationsporen mit solchen Durchmessern würden die Assoziation der α-Untereinheiten zur Bildung einer große Pore benötigen (van den Berg et al., 2004) und würden den retrograden Transport von ERAD-Substraten erlauben, an denen sperrige Oligosaccharidketten gebunden sind. (siehe I.2.1.1). Die Erhaltung der Permeabilitätsbarriere während der Transportprozesse könnte allein durch die strukturellen Eigenschaften der Translokationspore erklärt werden (van den Berg et al., 2004; Mitra et al., 2005).

Ein zweiter heterotrimerer Komplex, der Ssh1p-Komplex, der eine starke Ähnlichkeit zum Sec61-Komplex aufweist, wurde in Hefe beschrieben. Er besteht aus Ssh1p (verwandt zu Sec61p), aus Sbh2p (homolog zu Sbh1p) und aus Ssa1p (der γ-Untereinheit des Sec61-Komplexes) (Finke *et al.*, 1996). Auf der Basis verschiedener Erkenntnisse wird vermutet, dass dieser Komplex an dem cotranslationalen Transport beteiligt ist (Finke *et al.*, 1996; Wittke *et al.*, 2002; Helmers *et al.*, 2003).

In Säuger sind zwei weitere Proteine, Sec62p und Sec63p, gefunden worden, die miteinander und mit dem Sec61-Komplex assoziieren können (Daimon *et al.*, 1997; Skowronek *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Sie sind homolog zu den gleichnamigen Hefe-Proteinen, die eine essentielle Rolle beim Proteintransport spielen. Beide Proteine werden im rauen ER exprimiert, aber kleine Mengen von Sec62p wurden auch im glatten ER gefunden (Meyer *et al.*, 2000). Auch in weiteren

höheren Eukaryonten sind Sec62p-Homologe identifiziert worden. In *Drosophila melanogaster* wurde es Dtrp1 (<u>D</u>*rosophila* <u>tr</u>anslocation <u>protein</u> <u>1</u>) genannt (Noel und Cartwright, 1994). Das humane Sec62p, Htp1 (<u>h</u>uman <u>t</u>ranslocation <u>protein</u> <u>1</u>) weist die höchste Sequenz-Homologie zum Hefe-Protein in den Regionen, die die TM-Domänen flankieren, einschließlich des luminalen Segmentes auf (siehe Abb. 1). Die Sequenz-Homologie zu Dtrp1 reicht bis in die N- und C-Termini. Darüber hinaus teilt Htp1p weitere generelle Merkmale mit Dtrp1 wie das Hydrophobiemuster oder die Größe der cytosolischen und luminalen Domäne (siehe Abb. 2) (Daimon *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000). Das Membranprotein Sec63p besitzt eine luminale J-Domäne, wodurch es zur Familie der Hsp40-Chaperone gehört. Das humane Sec63p weist die höchste Sequenz-Homologie zum Hefe-Protein in der J-Domäne und in den N- und C-terminalen Segmenten auf (Skowronek *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000) (siehe Abb. 1).





Für Sec62p und Sec63p aus *S.cerevisiae* sind die Bindungsdomänen hellgrün markiert und miteinander verbunden. Für die Funktionalität essentielle Domänen sind blau dargestellt. Die Putative Effektordomäne von Sec62p ist gestreift dargestellt. In Sec62p und Sec63 aus *H.sapiens* sind die Regionen mit höherer Sequenz-Homologie zu den Hefe-Proteinen umrahmt. Die J-Domäne in Sec63p ist gepunktet dargestellt. Hauptsächlich azidische bzw. basische Regionen sind mit - bzw. + markiert. Die Zahlen entsprechen entweder den Aminosäureresten direkt vor oder nach den TM-Domänen oder den C-terminalen Aminosäureresten. Erläuterung im Text.

hSec62p dSec62p sSec62p	MAERRRHKKRIQEVGEPSKEEKAVAKYLRFNCPTKSTNMMGHRVDYFIASKA 9   MSEKKRARRRKDEYTEPGAQKVDKPSKDEKNVAKWLKKNVKTKKTKFLSHIVEYFTSSKA 9   MSAVGPGSNAGASVNGGSATAIATLLRNHKELKQRQGLFQAKQTDFFRYKRF 9   *: . : : : : : :	52 60 52
hSec62p dSec62p sSec62p	VDCLLDSKWAKAKKGEEALFTTRESVVDYCNRLLKKQFFHRALKVMKMKYDKDIKKEKDK IDALMKSKFTEGSNPLFTTREQVIEFLDVMLEHKFFHRAKKVPVTLEEIRGKSG VRALHSEEYANKSARQPEIYPTIPSNKIE : .*:::: ::.*	112 114 81
hSec62p dSec62p sSec62p	GKAESGKEEDKKSKKENIKDEKTKKEKEKKKDGEKEESKKEETPGTPKKKETKKKFKLEP : GDKKADKEKTQDKEKDKAKDEKKDTDPEGD-NGQGDGGASGNEKEKEKKKKKKKIRLDM : DQLKSREIFIQLIKAQMVIPVKKLHSQECKEHGLKPSKDFPHLI : :: : : : : : : : : : : : : : : : :	172 173 125
hSec62p dSec62p sSec62p	HDDQVFLDGNEVYVWIYDPVHFKTFVMGLILVIAVIAATLFPLWPAEMRVGVYYLSVGAG HPEQIFVDGSEAYVWIYDPIPLHYWIFGFILLLGAVGICLFPLWPPLLRKGVYYLSIAAA VSNKAQLEADEYFVWNYNPRTYMDYLIVIGVVSIILALVCYPLWPRSMRRGSYYVSLGAF :: ::* :** *:* ::: :: :: :: :: :**** :* ***:*:*	232 233 185
hSec62p dSec62p sSec62p	CFVASILLLAVARCILFLIIWLITGGRHHFWFLPNLTADVGFIDSFRPLYTHEYKG2 GFLVFILALTIVRLIVFIIVWALTGGKLHFWIFPNLTEDVSFFASFWPLYESNYNSDPNN GILAGFFAVAILRLILYVLSLIVYKDVGGFWIFPNLFEDCGVLESFKPLYGFGEKD2 ::. :: :: * *::: : **::*** *: ** *** :.	288 293 241
hSec62p dSec62p sSec62p	PKADLKKDEKSETKKQQKSDSEEKSDSEKKEDEEGKVGPGNHGTEGSGGERHSDTDSDRR SSAKTDKKSKSKDKKKEKESDAEDTAVDADGDADGDVDAEVSTLEPEKIELIKEHDTDME   SSAKTDKKSKSKDKKKEKESDAEDTAVDADGDADGDVDAEVSTLEPEKIELIKEHDTDME SSAKTDKKSKSKDKKKEKESDAEDTAVDADGDADGDVDAEVSTLEPEKIELIKEHDTDME   -TYSYKKKLKRMKKKQAKRESNKKKAINEKAEQN	348 353 274
hSec62p dSec62p sSec62p	EDDRSQHSSGNGNDFEMITKEELEQQTDGDCEEDEEEENDGETPKSSHEKS- 399 IRKRRKVGADDYEEDDVDEEETKRSPRIPKLERHATRDRIRRARVKITR 402	

#### Abb. 2 : Sequenzvergleich von Sec62p der Mensch, Drosophila und Hefe

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustelW des "European Bioinformatics Institute" (EBI) durchgeführt. **hSec62p**: Sec62p aus *Homo sapiens*, **dSec62p**: Sec62p aus *Drosophila melanogaster*, **sSec62p**: Sec62p aus *Saccharomyces* cerevisiae. Unterschtriechen sind die vorhergesagten Transmembrandomänen (Swiss-Prot/TrEMBL Data base). Positiv geladene Aminosäurereste sind grün (K, R, H), negativ geladene rot (E, D) dargestellt. "\*" bedeutet, dass die darüberliegenden Aminsäurereste identisch sind. ":" bzw. "." kennzeichnen konservierte bzw. semi-konservierte Aminosäurereste.

Welche Funktion im ER die Säugerproteine Sec62p und Sec63p ausüben, ist noch unbekannt. Die folgenden Beobachtungen lassen vermuten, dass diese Proteine *in vivo* Teil eines multifunktionellen Transportkomplexes sind (Tyedmers *et al.*, 2000). 1) Untersuchungen mit Hundepankreasmikrosomen zeigen, dass Sec62p und Sec63p im äquimolaren Verhältnis zu Sec61α in der ER-Membran vorliegen und immunoaffinitätschromatographische Analysen dieser Membranen zeigen, dass ein Teil des Sec62p und Sec63p miteinander und mit ribosomenfreien Sec61-Komplexen interagieren (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). 2) tailanchored-Proteine, die in der Regel posttranslational in die ER-Membran integriert werden (Abell *et al.*, 2004) und Signalanchored-Proteine, die cotranslational integriert werden, wurden in einem Säuger-System zu Sec61α, Sec61β, Sec62p und Sec63p quervernetzt (Abell *et al.*, 2003). 3). Dtrp1, das eine sehr hohe Homologie zu dem Säuger Sec62p aufweist (siehe Abb. 2), kann die Letalität eines SEC62-Knockouts in der Hefe aufheben und den *sec62*-assoziierten Translokationsdefekt komplementieren (Noel und Cartwright, 1994). 4) In der Hefe spielt Sec63p neben Kar2p, dem Hefe-Homologen von BiP, eine wesentliche Rolle beim cotranslationalen Transport (siehe I.3.2) und beim Export von ERAD-Substraten ins Cytosol (Plemper *et al.*, 1997). Auch für das Säuger Sec63p wurde eine Interaktion mit BiP beschrieben, die auf eine Chape-ron/Cochaperon-Weise stattfindet (Tyedmers *et al.*, 2000).

Am besten untersucht und bekannt sind Sec62p und Sec63p in der Hefe, in der sie essentielle Proteine darstellen (Deshaies und Schekman, 1989; Rothblatt *et al.*, 1989; Sadler *et al.*, 1989). Sie assoziieren mit zwei nicht essentiellen Proteinen, Sec71p und Sec72p, und bilden den Sec62/63-Subkomplex (Deshaies *et al.*, 1991; Brodsky und Schekman, 1993; Ng und Walter, 1996). Dieser und der Sec61-Komplex sind die Kern-Komponenten des Translokons für den posttranslationalen Transport in der Hefe, denn sie bilden eine funktionelle Einheit, den Sec-Komplex, der notwendig und ausreichend ist, um diesen Transportweg zu rekonstituieren (Panzner *et al.*, 1995). Der Sec62/63-Subkomplex wurde nur in Assoziation mit ribosomenfreien Sec61-Komplexen vorgefunden (Hartmann *et al.*, 1994; Panzner *et al.*, 1995).

Sec71p ist ein Typ I Membranprotein, dessen C-terminale Domäne als Anker für das membranassoziierte Sec72p dient. Sec72p wird gleichzeitig benötigt, um eine stabile Assoziation von Sec71p zum Subkomplex zu gewährleisten (Feldheim et al., 1993; Fang und Green, 1994; Feldheim und Schekman, 1994). Sec63p assoziiert mit Sec71p und Sec72p unabhängig von Sec62p (Deshaies et al., 1991; Ng und Walter, 1996). Sec62p hat zwei Bindungsdomänen für den Sec-Komplex. Über die basische N-terminale Domäne interagiert es elektrostatisch mit dem azidischen C-Terminus von Sec63p. Voraussetzung dafür ist die Phosphorylierung von zwei Threoninen in Sec63p durch die Proteinkinase CK2 (Wang und Johnsson, 2005). Die zweite, C-terminale Bindungsdomäne interagiert mit dem Sec-Komplex, wahrscheinlich auch durch Bindung an Sec63p (Ng und Walter, 1996; Wittke et al., 2000; Willer et al., 2003b). In vivo Versuche zeigen, dass die zwei Bindungsdomänen in Sec62p eine Effektordomäne in dem C-Terminus zum Subkomplex verankern, und dass sie in Abhängigkeit voneinander für die Lebensfähigkeit der Zelle notwendig sind (Wittke et al., 2000; Wang und Johnsson, 2005). In Sec63p sind sowohl die J-Domäne als auch der cytosolische C-Terminus essentiell für seine Funktionen (Sadler et al., 1989; Feldheim et al., 1992; Ng und Walter, 1996; Young et al., 2001).

Mutationen in jedem der vier Gene, die für die Komponenten des Sec62/63-Subkomplexes kodieren, führen zur Anhäufung cytosolischer Vorläufer-Formen von posttranslational zu translozierenden Proteinen, was die Vermutung erlaubt, dass sie eine Funktion bei frühen Schritten des posttranslationalen Transports als SS-Rezeptor ausüben. Sec63p wird auch für den cotranslationalen Transport benötigt (siehe I.3.2) und spielt neben Sec71p und Sec72p eine weitere Rolle bei der Karyogamie (Deshaies und Schekman, 1989; Rothblatt *et al.*, 1989; Sadler *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1992; Feldheim *et al.*, 1993; Fang und Green, 1994; Feldheim und Schekman, 1994). Die vermutete Rolle des Sec62/63-Subkomplexes als SS-Rezeptor wird durch Quervernetzungsund Rekonstitutionsanalysen (Müsch *et al.*, 1992; Matlack *et al.*, 1997; Plath *et al.*, 1998) und durch *in vivo*-Untersuchungen mittels split-Ubiquitin-Technik (Dünnwald *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 2000) unterstützt.

Obwohl die co- und posttranslationalen Transportwege mit wenigen Komponenten *in vitro* rekonstituiert werden können, gibt es jedoch *in vivo* zusätzlich assoziierte Proteine und Komplexe, die auch eine Rolle bei der Translokation durch bzw. Integration in die ER-Membran oder bei der anschließenden Proteinfaltung spielen können. Einige dieser assoziierten Komponenten sind: der Signalpeptidase-Komplex (SP), welcher die Abspaltung der Signalsequenz durchführt (Blobel und Dobberstein, 1975c; Jackson und Blobel, 1977; Abell *et al.*, 2003), die Oligosaccharyltransferase (OST), die Proteine während der Translokation glykosyliert (Silberstein und Gilmore, 1996; Knauer und Lehle, 1999), der "translocon-associated protein"-Komplex (TRAP), der Substrat-spezifisch eine Rolle bei der Proteintranslokation spielt (Wiedmann *et al.*, 1987; Fons *et al.*, 2003), und Calnexin, eines der Lektine, das für die Qualitätskontrolle von glykosylierten Proteinen verantwortlich ist (Molinari und Helenius, 2000; Helenius und Aebi, 2001; Snapp *et al.*, 2004).

#### I.3.2 Cotranslationaler Transport

Die Synthese von Proteinen kann sowohl an frei im Cytosol vorliegenden als auch an an der ER-Membran gebundenen Ribosomen beginnen (Potter und Nicchitta, 2002; Stephens *et al.*, 2005). Im ersten Fall tritt eine naszierende Kette nach dem Heraustreten aus dem ribosomalen Tunnelausgang als erstes mit dem <u>"n</u>ascent polypeptide-<u>a</u>ssociated <u>complex</u>" (NAC) in Kontakt (Wiedmann *et al.*, 1994). NAC bindet gleichzeitig an die Translokonsbindungsstelle des Ribosoms und verhindert so, dass Polypeptidketten ohne eine SS an den Translokationsapparat dirigiert werden (Lauring *et al.*, 1995a; Lauring *et al.*, 1995b; Powers und Walter, 1996; Möller *et al.*, 1998; Moller *et al.*, 1998). Wird jedoch ein sekretorisches Protein synthetisiert, so wird seine SS, sobald sie vollständig aus dem Ribosom herausgetreten ist, durch das "signal recognition particle" (SRP) erkannt und gebunden. Dies führt zu einem vorübergehenden Elongationsarrest, was eine vorzeitige Fertigstellung und Faltung des zu translozierenden Proteins verhindert (Walter und Blobel, 1981a; Walter *et al.*, 1981). Anschließend wird der Ribosom-naszierende Kette-Komplex (RNC-Komplex) über eine Interaktion des SRP mit seinem Rezeptor spezifisch an die ER-Membran angedockt (Walter und Blobel, 1981b; Gilmore *et al.*, 1982a; Gilmore *et al.*, 1982b; Meyer *et al.*, 1982).

SRP stellt einen 11S Ribonukleoproteinkomplex dar, der aus 6 Proteinuntereinheiten und einer 7S RNA besteht (Walter und Blobel, 1980; Walter und Blobel, 1982). Er kann in zwei funktionelle Domänen unterteilt werden. Die S-Domäne enthält vier der Proteinuntereinheiten das Heterodimer SRP68/72, SRP19 und SRP54, die nach der molekularen Maße benannt werden. SRP54 ist für die SS-Erkennung und Bindung verantwortlich (Siegel und Walter, 1988). Die Alu-Domäne vermittelt den Elongationsarrest (Siegel und Walter, 1986), wofür das SRP9/14 Heterodimer, das in dieser Domäne lokalisiert ist, essentiell ist (Siegel und Watter, 1985). Einen C-terminalen Bereich von 20 AA in SRP14 ist wesentlich für seine Beteiligung am Elongationsarrest (Thomas et al., 1997; Mason et al., 2000). In diesem Bereich befindet sich ein basisches hochgeladenes Peptidmotiv mit Ähnlichkeit mit dem im Hsp40-Chaperon Mtj1p (siehe I.2.2). SRP14 kann mit Ribosomen interagieren und die in vitro-Synthese von Proteinen hemmen. Das Vorhandensein des hochgeladenen Peptids hat sich wie bei Mtj1p für diese Interaktion sowie für den Effekt auf die Translation als wesentlich erwiesen (Dudek, eingereicht). Die Interaktion mit einer funktionierenden SS führt zur aktiven Konformation von SRP und damit zur hoch affinen Interaktion mit dem Ribosom ("targeting mode"). Hierbei interagiert die S-Domäne mit dem Ribosom in einem Bereich, der teilweise mit der Translokonsbindungsstelle überlappt und die Alu-Domäne orientiert sich bis in die ribosomale Untereinheitengrenzfläche. (Beckmann et al., 2001; Halic et al., 2004) (siehe Abb. 3). Das distale Segment mit SRP9/14 interagiert mit konservierten ribosomalen Komponenten, die auch die Bindungsstellen der Elongationsfaktoren und einiger Initiationsfaktoren darstellen (Choi et al., 2000; Gomez-Lorenzo et al., 2000; Carter et al., 2001; Wilson et al., 2002; Lomakin et al., 2003; Blanchard et al., 2004; Spahn et al., 2004; Allen et al., 2005). Dies lässt darauf schließen, dass der von der Alu-Domäne verursachte Elongationsarrest durch direkte Kompetition mit den Elongationsfaktoren verursacht wird (Halic et al., 2004).



Abb. 3 : "Targeting mode" von SRP an einem 80S Ribosom. Kryo-EM-Aufnahme (nach Halic et. al 2004 verändert).

Die effiziente Interaktion des SRP-RNC Komplexes mit der ER-Membran erfolgt durch die duale Bindung des Ribosoms und SRP mit dem heterodimeren SRP-Rezeptor (SR) (Mandon et al., 2003) (siehe Abb. 4). SR besteht aus SRa, einem membranassoziierten Protein, und aus SR<sup>β</sup>, einem Typ I Membranprotein (Gilmore et al., 1982a; Gilmore et al., 1982b; Tajima et al., 1986). Das Targeting der SRP-RNC-Komplexe wird durch die konzertierte Aktion dreier GTPasen reguliert. SRß kann nur in seiner GTPgebundenen Form mit SRa interagieren und somit den SRP-Rezeptor bilden (Miller et al., 1995; Schwartz und Blobel, 2003). Sbh1p, die β-Untereinheit des Hefe Sec61-Komplexes, agiert als Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (GEF) von SR $\beta$ , das in der Nähe bzw. mit dem Translokon assoziiert vorliegt (Wittke et al., 2002), und koppelt somit Translokation und Targeting (Helmers et al., 2003). SRP54 und SRa (mit ihren prokaryontischen Homologen) bilden aufgrund ihres unkonventionellen Regulationsmechanismus eine eigene Familie, die SRP-Familie, innerhalb der GTPase-Superfamilie (Bernstein et al., 1989; Römisch et al., 1989). Sie befinden sich im freien, nicht komplexierten Zustand in einer "leeren/offenen" Konformation, die sich durch eine niedrige Affinität für Nukleotide mit schneller und reversibler Bindung von GTP oder GDP auszeichnet (Rapiejko und Gilmore, 1994; Rapiejko und Gilmore, 1997). Das Targeting der SRP-RNC Komplex zum SR ist GTPunabhängig (Conolly und Gilmore, 1989; Rapiejko und Gilmore, 1994; Rapiejko und Gilmore, 1997). Die darauf folgende Interaktion zwischen SRP54 und SRα induziert eine "geschlossene" Konformation beider Proteine, bei der ihre Affinität für GTP steig. (Rapiejko und Gilmore, 1997; Shan und Walter, 2003). Wird GTP gebunden, so führt dies zu einer stabilen Bindung zwischen SRP54 und SRa, die wahrscheinlich durch das Ribosom stabilisiert wird

(Rapiejko und Gilmore, 1997; Peluso et al., 2001; Egea et al., 2004; Focia et al., 2004). Die Bildung dieses Komplexes führt zu einer Neuordnung der Interaktion von SRP54 mit dem Ribosom, die Voraussetzung für die Freisetzung der SS von SRP54 ist und wahrscheinlich die anschließende Interaktion mit dem Translokon ermöglicht (Pool et al., 2002). Der Freisetzung der SS folgt ihre Insertion im Translokationskanal (Gilmore und Blobel, 1983; High et al., 1991a; Kellaris et al., 1991). Der genaue Zeitverlauf und die Koordination der Ereignisse eine Rolle spielen (Song et al., 2000; Fulga et al., 2001). Nach oder während des SS-Transfers erfolgt die gegenseitige Aktivierung der GTPase-Aktivitäten und die darauf folgende GTP-Hydrolyse von SRP54 und SRa, die zum Dissoziation des Komplexes führt (Connolly et al., 1991; Powers und Walter, 1995; Shan und Walter, 2004). Nach dem Transfer bleibt der SR mit dem Translokon assoziiert (Snapp et al., 2004). Nachdem SRP54 den RNC-Komplex freilässt, sollte die weitere Synthese der Polypeptidkette erfolgen. Es wird vorgeschlagen, dass in vivo die Existenz von vollständig assoziierten Translokons, die alle notwendige Komponenten enthalten, einen effizienten Übergang der RNC-Komplexe zum Translokon erlaubt (Snapp et al., 2004). Die beschriebene Targeting-Schritte entfallen, wenn die Initiation der Translation an einem bereits mit dem Translokon assoziierten Ribosoms erfolgt (Potter und Nicchitta, 2000; Potter und Nicchitta, 2002).

Auf der Basis von Ribosomen-Bindungsexperimenten von Borgese et al. (1974) wurden mehrere putative Ribosomenrezeptoren in der ER-Membran vorgeschlagen: der Sec61-Komplex (Görlich und Rapoport, 1993; Kalies et al., 1994) sowie die Säuger-Proteine p180 (Savitz und Meyer, 1990; Savitz und Meyer, 1993; Wanker et al., 1995; Morrow und Brodsky, 2001) und p34 (Tazawa et al., 1991; Ichimura et al., 1992). Obwohl es heute allgemein anerkannt ist, dass der Sec61-Komplex die Rolle des Ribosomenrezeptors während der Translokation eines Proteins übernimmt (Kalies et al., 1994; Hanein et al., 1996; Beckmann et al., 1997; Ménétret et al., 2000; Raden et al., 2000; Beckmann et al., 2001; Morgan et al., 2002; van den Berg et al., 2004; Menetret et al., 2005), kann die Beteiligung anderer ER-Membranproteine nicht ausgeschlossen werden (Levy et al., 2001). Kürzlich ist für Mtj1p/ERj1p (siehe I.2.2) gezeigt worden, dass es mit der großen ribosomalen Untereinheit im Bereich des Tunnelausgangs interagiert (Blau et al., 2005). Die Interaktion des RNC-Komplexes mit dem Sec61-Komplex ist in einem ersten Stadium instabil. In diesem Stadium ist der gerade angedockte Kanal auf der luminalen Seite durch das Hsp70-Chaperon BiP versiegelt (Hamman et al., 1998) (siehe I.2.1.1). Wenn die Kette eine Länge von ca. 70 AA erreicht, erfolgt einer zweite, für die effiziente Translokation entscheidende Erkennungsschritt der SS im Translokon (siehe I.3.1) (Crowley et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995; Mothes et al., 1998). Die SS wird zuerst mit ihrem N-Terminus inseriert (N-luminal/C-cytosolisch) und kann dann in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung ihre Orientierung im Translokon zu einer Loop-Konformation invertieren (N-cytosolisch/C-luminal) (Goder und Spiess, 2003). Die Signalseguenzbindungsstelle im Translokon befindet sich an der Grenzfläche zwischen Sec61a, das spezifisch mit der SS interagiert, TRAMp und den Lipiden der Membran (Mothes et al., 1998; Plath et al., 1998). Die Interaktion der SS mit dem Translokon führt zur stabilen Bindung des Ribosoms und zu einer Konformationsänderung des Translokons, die wiederum die Offnung der Translokationspore zum Lumen zur Folge hat. (Crowley et al., 1994; Kalies et al., 1994; Wiedmann et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995; Mothes et al., 1998; Pilon et al., 1998; Wirth et al., 2003). Verschiedene in vivo und in vitro Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung von BiP/Kar2p in Verbindung mit Sec63p und ATP an dieser Offnung der Pore hin (Zimmermann et al., 1991; Brodsky et al., 1995; Hamman et al., 1998; Young et al., 2001). Dagegen zeigen in vitro-Versuche, dass allein die Interaktion eines Substrats reicht, um das Translokon zu aktivieren (Görlich und Rapoport, 1993; Wirth et al., 2003). Die stabile Interaktion zwischen Ribosom und Translokon ist durch hochauflösende Kryo-EM-Aufnahmen gezeigt worden. Die Aufnahmen zeigen, dass das Ribosom im Bereich des Tunnelausgangs durch Proteine und die 28S rRNA mit dem Translokon verbunden ist (Prinz et al., 2000; Morgan et al., 2002; Menetret et al., 2005; Mitra et al., 2005). Die Bindungsstelle des Translokons involviert die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit des Sec61-Komplexes (Kalies et al., 1994; Raden et al., 2000; Levy et al., 2001; van den Berg et al., 2004; Mitra et al., 2005). Die Interaktion erlaubt die kontinuierliche Ausrichtung des ribosomalen Tunnelausgangs mit der Translokationspore, wobei dazwischen eine Lücke von etwa 15-20 Å bleibt. Während der stabilen Interaktion des Ribosoms mit dem Translokon wird die cytosolische Seite der Pore versiegelt (Crowley et al., 1994). Dies geschieht wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung des Translokons, die durch die Interaktion mit dem Ribosom induziert wird (Wirth et al., 2003). Bei der Integration von Membranproteinen erfolgen alternative cytosolische und luminale Versiegelungszustände der Pore, die von den Transmembransequenzen im ribosomalen Ausgangstunnel sehr präzise reguliert werden. Diese Versiegelungszustände zusammen mit der Anwesenheit einer Lücke zwischen Ribosom und Translokon würden den Durchgang cytosolischer Domänen von integralen Membranproteinen während ihrer Integration in die Membran erlauben (Liao et al., 1997; Haigh und Johnson, 2002; van den Berg et al., 2004; Woolhead et al., 2004; Menetret et al., 2005; Osborne et al., 2005). Die

hydrophoben TM-Domänen werden in der Translokationspore durch eine laterale Öffnung im Kanal in den hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht überführt (Martoglio *et al.*, 1995; Borel und Simon, 1996; Heinrich *et al.*, 2000; Mitra *et al.*, 2005).

Nachdem der RNC-Komplex mit dem Translokon assoziiert hat, erfolgt die weitere Synthese der naszierenden Kette und deren gleichzeitige Translokation durch die Translokationspore, bis sie vollständig in das Lumen des ER gelangt (Elongation bzw. Termination). Während des Transports erfolgt die Abspaltung der SS (Prozessierung) durch den Signalpeptidase-Komplex (SP) (Blobel und Dobberstein, 1975c; Jackson und Blobel, 1977). Eine effiziente Termination der Translokation erfordert die Anwesenheit der luminalen Proteinen des ER. Die alkalische Extraktion der luminalen Proteine (Retikuloplasma) aus nativen Säugermikrosomen bewirkt, dass nach der Prozessierung und luminalen N-Glykosylierung des Substrats dieses retrograd ins Cytosol gelangen kann, was sich als Verlust der Translokationseffizienz ausdrückt. Die Effizienz der Translokation kann nur durch Zurückgabe des Retikuloplasmas wiederhergestellt werden und zeigt so eine Funktion der luminalen Proteine bei späten Schritten der Translokation (Nicchitta und Blobel, 1993). Die Untersuchungen mit Proteoliposomen von Tyedmers et al. (2003) haben gezeigt, dass BiP für den positiven Effekt des Retikuloplasmas auf die Translokation verantwortlich ist, und dass dessen Effekt auf die Translokation auf einer direkten Interaktion mit dem Substrat im Lumen der Vesikel beruht. So erhöht BiP die Transporteffizienz von Proteinen in das ER des Säugers. Es ist jedoch unklar, ob diese Interaktion bereits während oder erst nach Beendigung der Translokation stattfindet. Auch in der Hefe wurde sowohl in vivo als auch in vitro eine essentielle Rolle von Kar2p und Sec63p beim cotranslationalen Transport gezeigt, wofür die cytosolische Domäne und die J-Domäne von Sec63p notwendig sind (Vogel et al., 1990; Nguyen et al., 1991; Brodsky et al., 1995; Young et al., 2001; Willer et al., 2003a). Weiterhin konnte in Quervernetzungsexperimenten gezeigt werden, dass Faltungskatalysatoren wie Proteindisulfidisomerasen und Cyclophiline translozierende Proteine während der späten Schritte des Transportes binden, was auf eine Rolle bei der Termination des Transports hindeutet (Klappa et al., 1995; Volkmer et al., 1997). Auch andere molekulare Chaperone wie Grp170 (Dierks et al., 1996) oder die Lektine Calretikulin und Calnexin könnten im Säuger-ER diese Funktion ausüben (Ou et al., 1993; Molinari und Helenius, 2000).

Nachdem die Polypeptidkette vollständig transportiert ist, bleibt das Translokon mit assoziierten Komponenten wie SR, TRAMp, TRAP und OST erhalten (Nikonov *et al.*, 2002; Potter und Nicchitta, 2002; Snapp *et al.*, 2004; Stephens *et al.*, 2005). Auch beide Untereinheiten des Ribosoms dissoziieren nicht von dem Translokon ab und können somit weitere Synthesezyklen eingehen (siehe Abb. 4). Bei der Initiation der Synthese eines sekretorischen Proteins besteht die Assoziation des Ribosom mit dem bereits assoziierten Translokon und erfolgt der Transport der Kette nach der Erkennung der SS, wohingegen die Initiation der Synthese eines nicht-sekretorischen Proteins eine Dissoziation von der Membran bewirkt (Potter und Nicchitta, 2000; Potter und Nicchitta, 2002).



Abb. 4 : Schematische Darstellung des cotranslationalen Transportmechanismus Sec61-K: Sec61-Komplex. SP: Signalpeptidase-Komplex. PDI: Proteindisulfidisomerasen. Cyc: Cyclophiline In dieser Darstellung wird angenommen, dass das Translokon aus zwei Sec61-Komplexen besteht. Ebenfalls wird hier das Verschließen des Translokons durch BiP als eine direkte Interaktion von BiP mit dem Sec61-Komplex dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

#### I.3.3 Posttranslationaler Transport

Der posttranslationale Transport wurde bisher hauptsächlich in Hefe untersucht, denn im Gegensatz zum Säuger spielt dieser Transportweg hier eine wichtige Rolle (Hann und Walter, 1991). So müssen alle essentiellen Proteine über den posttranslationalen Mechanismus transportiert werden können, denn Hefe-Stämme, in denen der cotranslationale Transport ausgeschaltet wurde, sind trotzdem lebensfähig (Mutka und Walter, 2001). Die Auswahl eines dieser Wege liegt an der Zusammensetzung der SS. So tendieren SS mit einer relativ niedrigen Hydrophobie zum posttranslationalen Transport, während stärker hydrophobe SS sowie N-terminale Signalankersequenzen zum cotranslationalen Transport führen (Ng *et al.*, 1996).

Der posttranslationale Transport benötigt cytosolische Chaperone, um die fertig synthetisierten Vorläuferproteine in einem transportkompetenten Zustand zu halten (Zimmermann und Meyer, 1986; Wiech *et al.*, 1987). Im Säuger üben diese Funktion Hsc70 und eine weitere cytosolische Komponente, wahrscheinlich ein Hsp40-Cochaperon, aus (Zimmermann *et al.*, 1988). In der Hefe sind es die Hsp70-Homologen Ssa1p und Ssa2p (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988) in Kooperation mit ihrem Hsp40-Cochaperon Ydj1p (Caplan *et al.*, 1992a; Cyr *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1996), welches wahrscheinlich auch für den Nukleotidaustausch verantwortlich ist (Ziegelhoffer *et al.*, 1995). Ydj1p ist an der ER-Membran verankert und so wird vorgeschlagen, dass es die Freisetzung eines am Ssa1p gebundenen Präproteins katalysiert und somit zu dessen Übergabe an die Translokationsmaschinerie führt (Caplan *et al.*, 1992a; Caplan *et al.*, 1992b; Lyman und Scheckman, 1996). Die Ergebnisse von Plath et al. (Plath und Rapoport, 2000) deuten dagegen auf eine spontane Freilassung der Substrate von den Chaperonen hin, bevor es zur Assoziation mit dem Translokationsapparat kommt.

Das Targeting der SS an die ER-Membran erfolgt beim posttranslationalen Transport durch direkte Interaktion mit dem Translokon, dessen Oligomerisierung hier nicht durch Ribosomen sondern wahrscheinlich durch Interaktion mit dem Sec62/63-Subkomplex induziert wird (Hanein *et al.*, 1996). Sec72p könnte dabei eine Rolle spielen (Willer *et al.*, 2003a) (siehe I.3.1). Die Interaktion der SS mit dem Translokon erfolgt ATP-unabhängig und erfordert eine funktionelle SS und einen intakten Sec-Komplex (Müsch *et al.*, 1992; Matlack *et al.*, 1997). Neben dem Sec62/63-Subkomplex spielt auch Sec61p eine direkte Rolle bei der Interaktion mit der SS (Pilon *et al.*, 1998). Kinetik-Untersuchungen deuten auf eine Interaktion der SS mit Sec62p, Sec71p

#### I. Einleitung

und Sec61p in einem einzigen Schritt hin, wobei die Autoren nicht ausschließen können, dass eine sehr schnelle erste Interaktion der SS allein mit dem Sec62/63-Subkomplex vor den untersuchten Zeiten möglich wäre (Plath et al., 2004). Das Hsp70 Chaperon Kar2p spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Interaktion der SS mit dem Translokon, denn ein mutiertes Kar2p in Hefe-Mikrosomen verhindert die Interaktion eines posttranslationalen Substrats mit dem Translokon (Sanders et al., 1992). Der Prozess läuft einschließlich bis zur Insertion der SS in ihre Bindungstelle im Translokon ATP-unabhängig ab. Die Bindungsstelle der SS ist in der Grenzfläche zwischen Sec61p, Sec62p, Sec71p, Sec72p und den Lipiden der Membran lokalisiert, wo der hydrophobe Kern der SS eine α-helikale Konformation annimmt (Plath et al., 1998; van den Berg et al., 2004). Die Interaktion der SS verursacht eine Konformationsänderung im Translokon, die zur Offnung der Translokationspore führt (Wirth et al., 2003). Genetische Studien haben gezeigt, dass Sec61p eine wichtige Rolle bei der Öffnung der Translokationspore spielt (Pilon et al., 1998). Auch Kar2p scheint in Verbindung mit Sec63p, seinem Hsp40-Cochaperon, bei diesem Vorgang beteiligt zu sein (Sanders et al., 1992; Brodsky und Schekman, 1994; Brodsky et al., 1995; Pilon et al., 1998).

Nachdem die naszierende Kette im Translokationskanal inseriert ist, wird die koordinierte Aktion von Kar2p und Sec63p benötigt, um die anschließende ATPabhängige Elongation der Translokation zu gestatten (Matlack et al., 1997; Plath et al., 1998; Matlack et al., 1999). Die Beteiligung von Kar2p und Sec63p und die Bedeutung ihrer Interaktion für den posttranslationalen Transport wurden zuerst auf genetischer Ebene (Rothblatt et al., 1989; Sadler et al., 1989; Vogel et al., 1990; Nguyen et al., 1991; Scidmore et al., 1993), dann auch biochemisch durch Rekonstitutionsversuche (Sanders und Schekman, 1992; Brodsky und Schekman, 1993; Lyman und Schekman, 1995) gezeigt. Dabei wirkt Sec63p in einer transienten Interaktion durch seine J-Domäne als Cochaperon von Kar2p und stimuliert seine ATPase-AKtivität, was zur Bindung des Substrats führt (Brodsky und Schekman, 1993; Corsi und Schekman, 1997; Misselwitz et al., 1999). Der ATP-Zyklus von Kar2p wird durch den Nukleotidaustauschfaktor Sls1p, welcher für einen effizienten Proteintransport notwendig ist, abgeschlossen. Diese Funktion kann jedoch auch von dem Hsp70-Chaperon Lhs1p ausgeübt werden (Boisramé et al., 1998; Kabani et al., 2000; Tyson und Stirling, 2000). Auch im Säuger wurde für BiP gezeigt, dass es für die Effizienz der Translokation eines posttranslationalen Substrats in rekonstituierten Proteoliposomen notwendig ist (Tyedmers et al., 2003). Es wird vorge-

schlagen, dass Kar2p als molekulare "Ratchet" handelt: Die Translokationspore wäre passiv und Kar2p würde erst durch seine Interaktion mit der naszierenden Kette deren Zurückgleiten verhindern und somit den Verlauf des Transports in Richtung Lumen bestimmen ("Brownian Motion"). Dies würde mit sich bringen, dass mehrere Kar2p-Moleküle die Kette binden müssen, bis sie vollständig in das Lumen gelangt (Simon et al., 1992), was Matlack et al. (1999) experimentell bestätig haben (siehe Abb. 5). Dass die naszierende Kette in der Translokationspore hin und her gleitet (Ooi und Weiss, 1992; Nicchitta und Blobel, 1993; Matlack et al., 1999) deutet darauf hin, dass die Pore an der Bestimmung der Bewegungsrichtung des Substrats nicht beteiligt ist. Die Rekonstitution der posttranslationalen Translokation in Proteoliposomen, die Antikörper gegen das Substrat anstelle von Kar2p enthielten, zeigen, dass "Ratcheting" ausreichend wäre, um einen effizienten Transport zu gewährleisten (Matlack et al., 1999). Mathematische Modelle kommen ebenfalls zu diesem Schluss (Liebermeister et al., 2001; Elston, 2002). Ein alternatives Modell beschreibt den Kar2p-Sec63-Komplex als einen Motor, der durch aufeinander folgende ATP-Bindung/Hydrolyse-Zyklen ein aktives Ziehen der Polypeptidkette durch Bindung/Freisetzung von Kar2p erlauben würde. Um ein aktives Ziehen zu erzielen müsste Kar2p an der Membran verankert sein (Glick, 1995).

Genetische Studien mit Lhs1p defizienten Hefe-Stämmen zeigen, dass dieses nicht essentielle Hsp70-Chaperon neben Kar2p eine Rolle beim posttranslationalen Transport spielt (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996; Hamilton und Flynn, 1996; Tyson und Stirling, 2000). Es ist möglich, dass neben Kar2p und Lhs1p auch Modifikationen des Substrats wie Disulfidbrücken oder N-Glykosylierung am "Ratcheting" beteiligt sind (Klappa *et al.*, 1995; Volkmer *et al.*, 1997; Molinari und Helenius, 2000; Helenius und Aebi, 2001).
#### I. Einleitung





### I.4 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob das luminale Hsp70-Chaperon BiP die beschriebene Effizienzsteigerung der cotranslationalen Translokation ausübt (siehe I.3.2), indem es bereits während des Transports an die naszierende Kette bindet und somit die Richtung des Transports sicherstellt (Ratchet Mechanismus) oder erst nach der vollständigen Translokation der Kette mit dieser interagiert und deren retrograden Transport verhindert (Trapping Mechanismus). Hierzu wurde ein artifizielles System verwendet, in dem BiP funktionell durch Avidin in Proteoliposomen ersetzt und der Effekt auf biotinylierte Substrate untersucht wurde (siehe III.1.1).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die physiologische Rolle von Sec62p des Säugers zu gewinnen (siehe I.3.1). Sec62p besitzt ein basisches, hochgeladenes Oligopeptidmotiv, das in dem homologen Protein der Hefe nicht vorhanden ist. Dieses Peptidmotiv ist in anderen Proteinen, Mtj1p und SRP14, für ihre Interaktion mit Ribosomen wesentlich (Dudek *et al.*, 2005; Dudek *et al.*, 2006). Es sollte untersucht werden, ob Sec62p ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der Proteinsynthese an der ER-Membran durch eine mögliche Interaktion mit Ribosomen ausübt. Dafür wurden Fragmente von Sec62p in *E. coli* synthetisiert und durch klassische Ribosomenbindungversuche, Fraktionierungsstudien sowie *in vitro*-Translationsuntersuchungen analysiert.

### II. MATERIAL UND METHODEN

### **II.1 Material**

### II.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Düsseldorf: Gilson-Pipetten

AGFA-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevamatic 60

<u>Amersham Biosciences, Freiburg</u>: His Trap<sup>™</sup> HP 5 ml affinity columns; Hyperfilm<sup>™</sup>ECL; PD-10 Columns

<u>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</u>: "Äkta-Prime"-Apparatur, Personal Densitometer, Phosphorimager<sup>TM</sup>- SF mit Exponierplatten (Storage Phosphor Screen) und Exponier-Kammer (Exposure Cassette)

<u>Amicon Inc., Beverly, USA</u>: Centricon<sup>®</sup>-Centrifugal Filter Devices (2 ml YM-30 und YM-10)

Bachofer, Reutlingen: Inkubator BE-400 "Hy-St"

B. Braun AG, Melsungen: Dounce-Homogenisatoren

<u>Beckman, München</u>: Optima<sup>™</sup> TLX Ultrazentrifuge und Optima<sup>™</sup> MAX-E Ultrazentrifuge mit TLA 100.3 und TLA 100 Rotor, J2-MC Zentrifuge (Kühlzentrifuge) mit JA-10 und JA-20 Rotor, L-80-Ultrazentrifuge mit Ti 70 und SW55TI Rotor, GS-6KR-Zentrifuge (Bactifuge)

<u>BioRad München</u>: Disposable chromatography columns (20 ml), Trans-Blot<sup>®</sup>Elektrophoretic Transfer Cell (Apparatur zum Blotten von SDS-Gelen); Spannungsgerät Power-PAC 300

Eastman Kodak-Company, Rochester, NY, USA: Röntgenfilme X-Omat AR

Eppendorf, Hamburg: Centrifuge 5402 (Kühlzentrifuge), Centrifuge 5415C (Tischzentrifuge), Thermostat 5320 (Heizinkubator)

<u>Fröbel Labortechnik, Wasserburg</u>: Geltrockner, Sterilbank, Speed-Vac (evaporator centrifuge CON-1000), Ultraschallgerät mit VCX-Mikro- und Makrotip, Vacuum-System CON-JET

Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen: Rotationsschüttler

Greiner und Söhne, Nürtingen: Petrischalen

Hamilton-Bonaduz, Schweiz: Glasspritzen

<u>Heidolph</u>: Magnetrührer (MR 3000), Überkopf-Schüttler (Reax 2), Rotor RZR 2020 <u>Heraeus, Hanau</u>: Brutschränke

Infors, Bottmingen, CH: Inkubationsschüttler Julabo, Seelbach: Wasserbäder Memmert und Co. KG, Schwabach: Brutschrank BE500 Millipore Co., Bedford MA, USA: Inmobilon-P Transfermembran (Porengröße: 0,45 µm), Semi-Dry-Elektroblotter MoBi-Tec, Göttingen: 1-ml "Mobitec- Säulen" Perkin Elmer, USA: PCR-Maschine (Gene Amp PCR System 2400) Pharmacia Biotech, Freiburg: ImageMaster VDS, Peristaltikpumpe (Pump P-1), Photometer Ultrospec 3000, Spannungsgeräte EPS 3500 und EPS 600 <u>Pierce, Rockford, USA</u>: Polypropylen-Säulen (5 ml) Sarstedt, Nümbrecht: Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) Sartorius, Göttingen: Feinwagen BP61, BP 4100, LA420 Schleicher & Schüll, Dassel: Filterpapier DE81, Sterilfilter (0,2 µm) Schütt, Göttingen: Autoklav Scientific Industries, Bohemie N.Y., USA: Vortex-Mixer (Genie 2<sup>™</sup>) Sigma-Aldrich, St.Louis, USA: "Spin-X<sup>®</sup> Microcentrifuge filters" 0,22 µm Spectrum Medical Industries Inc.: Dialyseschläuche (Spectra/Por<sup>®</sup>, MWCO 12-14 kDa, 16 mm Durchmesser) Walters-Millipore, Milford, USA: Milliporewasseranlage Milli-Q WTW, Weilheim: pH-Meter pH 537 Elektrophoresekammern (Eigenbau der Werkstatt Biochemie 1, Göttingen)

### II.1.2 Chemikalien

Alexis Biochemicals, Lausen, CH: Aurintricarboxylsäure (ATA)

<u>Amersham Biosciences, Freiburg</u>: ECL-Western Blot Detektionssystem, Glutathion Sepharose<sup>®</sup> 4B, m<sup>7</sup>GpppG, [<sup>35</sup>S]-Methionin (1000 Ci/mmol), Nukleosidtriphosphate (ATP, UTP,GTP,CTP)

Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL: Phospholipide aus Ei (Avanti-PC)

<u>BioRad, München</u>: Bio-Beads SM-2, BioRad Protein Assay, "Kaleidoscope Prestained Standards"

Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla CA: CHAPS

<u>Difco Laboratories, Detroit, USA</u>: Bacto Agar, Bacto Trypton, Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)

Genomed, Bad Oeyenhausen: Midi-Präparation Jetstar Kit

GibcoBRL, Heidelberg: Agarose, 1kb DNA-Marker, 1 kb DNA-Marker

Invitrogen GmbH, Karlsruhe: BenchMark<sup>™</sup> Protein Ladder

Life-Technologies, Grand Island NY, USA: 10-kDa-Leiter-Protein-Molekularmassenstandard

Promega Biotec, Madison, USA: RNasin<sup>®</sup>-Ribonukleaseinhibitor

Qiagen GmbH, Hilden, Germany: Ni-NTA-Agarose

<u>Riedel-de-Hahn, Hannover</u>: Aceton, Chloroform, Essigsäure, Trichloressigsäure <u>Roche Diagnostics, Mannheim</u>: ATP, DTT, High Pure PCR Product Purification Kit, PCR-Nukleotid-Mix mit je 10 mM dNTPs, Translation Kit-Retikulozyten-Typ II, Biotin *in vitro* Translation Kit, Rapid Translation System RTS500 Proteo Master *E. Coli* HY Kit, Streptavidin-POD Konjugat, Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> Set, Streptavidin Magnetic Particles, BM Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin/Streptavidin) <u>Serva, Heidelberg</u>: Acrylammid, Ammoniumpersulfat (AMPS), Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie-Brilliant-Blue R250 und G250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Na-Dodecylsulfat (SDS), Saccharose, TEMED, TritonX-100 <u>Sigma-Aldrich, München</u>: β-Mercahpoethnol, Ampicillin, Avidin (aus Eiklar), BSA, Cycloheximid, DMSO, Glucose, Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Molekularmassenmarker, PMSF

Alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck Darmstadt bezogen.

### II.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Diagnostics, Mannheim) Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim) *Pwo* DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) Restriktionsendonukleasen (Roche, New England Biolabs, MBI Fermentas) RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) SP6 RNA-Polymerase (Promega Biotec, Madison, USA) T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) T4 DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)

### II.1.4 Antikörper

Antikörper anti-Sec61ap: Peptidantikörper aus Kaninchen, hergestellt bei der Firma EURO-GENTECH, Belgien. Verdünnung für Western-Blot 1:1000.

Antikörper anti-Se62p: Peptidantikörper aus Kaninchen, hergestellt von W. Nastainczyk, Homburg. Verdünnung für Western-Blot 1:1000.

Als sekundärer Antikörper wurde ein Meerettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet. Verdünnung für Western-Blot 1:1000.

Antikörper anti-5His: POD gekoppelter Peptidantikörper von der Firma QUIAGEN (Penta-His<sup>™</sup>). Verdünnung für Western-Blot 1:1000.

#### II.1.5 Plasmide

Name	Beschreibung und Herkunft
рВ4	enthält die kodierende Sequenz für Präprolaktin aus Rind; P.Walter, Department of Biochemistry and Biophysics, Uni- versity of California, School of Medicine, San Francisco, USA
pET1/195	enthält die kodierende Sequenz für Sec62N-His <sub>6</sub> ; MicroMol, Karlsruhe
pET-24d(+)	Kloniervektor für pET1/195; Novagen, Darmstadt
pGEM-luc (pLUC6)	enthält die kodierende Sequenz für die Luciferase aus dem Leuchtkäfer <i>Photinus Pyralis</i> ; Promega Biotec, Madison, USA
pGEX-4T-1-MTJ1-c	enthält die kodierende Sequenz für GST-Mtj1p-C aus Maus; Dr. Johanna Dudek, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes
pGEX-4T-TEV-SRP14	enthält die kodierende Sequenz für GST-SRP14 aus Maus; Dr. Johanna Dudek, Medizinische Biochemie und Moleku- larbiologie, Universität des Saarlandes
pGEX-4T-TEV-SRP14-∆C	enthält die kodierende Sequenz für GST-SRP14∆C aus Maus; Dr. Johanna Dudek, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes
pGEX-His <sub>6</sub>	Kloniervektor für pGEX-SEC62N∆N10 und pGEX- SEC62N98-180; enthält die kodierende Sequenz für His <sub>6</sub> ; Dr. Johanna Dudek, Medizinische Biochemie und Moleku- larbiologie, Universität des Saarlandes
pGEX-SEC62N∆N10	enthält die kodierende Sequenz für Sec62N∆N10-His <sub>6</sub> ; Dr. Patrick Maurer, Medizinische Biochemie und Molekular- biologie, Universität des Saarlandes

Tabelle 1 : Verwendete Plasmide

pGEX-SEC62N98-180	enthält die kodierende Sequenz für Sec62N98-180-His <sub>6</sub> ; Dr. Patrick Maurer, Medizinische Biochemie und Molekular- biologie, Universität des Saarlandes
pIVEX-GST	Kloniervektor für GST-Sec62C; Roche, Mannheim
pIVEXGST-SEC62C	enthält die kodierende Sequenz für GST-Sec62C; diese Arbeit
pMB9	enthält die kodierende Sequenz für eine modifizierte Form der Luciferase (enthält die Signalsequenz von Präprolak- tin); Dr. Michael Brunke, Göttingen
pQE-30	Kloniervektor für pQE-245/399; Quiagen, Hilden
pYMCS-Sec62	enthält die kodierende Sequenz für das humane Sec62p; MicroMol, Karlsruhe

### II.1.6 Oligonukleotide

Für die Herstellung des pIVEXGST-SEC62C-Plasmids wurde als Kloniervektor das pIVEXGST Plasmid über seine *Nde*I und *Xho*I Schnittstellen verwendet. Dieser Vektor, der die kodierende Sequenz für GST enthält, wurde gewählt, da er speziell für die Anwendung in dem RTS 500 System (siehe II.4.2) geeignet ist. Als Template-DNA, für die Herstellung des Inserts, wurde das Plasmid PYMCS-SEC62N eingesetzt. Dieses enthält die kodierende Sequenz für das humane volle Länge Sec62p. Durch die für die PCR angewendeten Primer konnten die Schnittstellen für *Nde*I und *Xho*I in die PCR-Fragmente einkloniert werden. Die Sequenz der Primer waren folgende:

Stromaufwärts-Primer: 5'-GGGAATTC<u>CATATG</u>CGATGCATTCTATTTCTCATC-3' Stromabwärts-Primer: 5'-CCG<u>CTCGAG</u>TTATGATTTTCATGTGAAGATTTAGGTG-3' Die eingefügten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Durch den Stromabwärts-Primer wurde ein Stop-Codon einkloniert (fett markiert)

Alle Klonierungsschritte sind in Kapitel II.2 beschrieben.

### II.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 2 . Verwendete Baktenenstamme	Tabelle 2	:	Verwendete	Bakterienstämme
---------------------------------------	-----------	---	------------	-----------------

Bakterienstamm	Beschreibung
E. coli BL21 (DE3) pLysS	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> ( $r_B^-m_B^-$ ) <i>gal <math>\lambda</math> (DE3)</i> [pLysS Cam <sup>R</sup> ] BL21 ist ein proteasedefizienter <i>E. coli</i> -Stamm. Er enthält ein plasmidkodiertes lysozymähnliches Protein, das beim Einfrie- ren und Wiederauftauen aktiviert wird und die Zelllyse bewirkt. (Studier <i>et al.</i> , 1990)
E. coli JM101	F' <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>proB</i> <sup>+</sup> <i>laql</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15lsupE thi-1</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
E coli M15	enthält ein Repressorplasmid [pREP4] mit KanR Bezogen von der Firma Quiagen, Hilden

### II.1.8 Rekombinante Proteine

#### Tabelle 3 : Verwendete bzw. untersuchte Proteine

Name	Beschreibung
ppL	Präprolaktin (aus Rind). Synthetisiert durch <i>in vitro</i> -Translation in Retikulozytenlysat. mRNA erzeugt nach Translokation von pB4 (mit <i>Eco R</i> I linearisiert).
ppL86mer	C-terminal verkürzte Form von ppL, aus 86 AA bestehend. Synthetisiert durch <i>in vitro</i> -Translation in Retikulozytenlysat. mRNA (ohne Stop-Codon) erzeugt nach Translokation von pB4 (mit <i>Pvu</i> II linearisiert).
Luc	Luciferase aus dem Leuchtkäfer <i>Photinus Pyralis</i> . Synthetisiert durch <i>in vitro</i> -Translation in Retikulozytenlysat. mRNA erzeugt nach Translokation von pLUC6.
pLuc	Präluciferase. Modifizierte Form der Luciferase aus dem Leucht- käfer <i>Photinus Pyralis</i> die die Signal-Sequenz von Präprolaktin enthält. Synthetisiert durch <i>in vitro</i> -Translation in Retikulozytenly- sat. mRNA erzeugt nach Translokation von pMB9 (mit <i>Eco</i> RI) linearisiert).
Sec62N-His <sub>6</sub>	N-terminal cytosolische Domäne des humanen Sec62p, C-termi- nal His <sub>6</sub> markiert. Synthetisiert in <i>E. coli</i> -BL21. Plasmid pET1/195.
GST-Sec62C	C-terminal cytosolische Domäne des humanen Sec62p, N-termi- nal GST markiert. Das GST ist N-terminal an His <sub>6</sub> verknüpft. Synthetisiert in RTS 500 System. Plasmid pIVEXGST-SEC62C.
Sec62N∆N10-His <sub>6</sub>	N-terminal cytosolische Domäne des humanen Sec62p, das N- terminal in 10 AA verkürzt ist. C-terminal His <sub>6</sub> markiert. Syntheti- siert in <i>E. coli</i> -JM101. Plasmid pGEX-SEC62N∆N10.

Sec62N98-180-His <sub>6</sub>	Fragment der N-terminal cytosolischen Domäne von den huma- nen Sec62p, AA98 bis AA180. Synthetisiert in <i>E. coli</i> -JM101. Plasmid pGEX-SEC62N98-180
Mtj1p-C∆C	C-terminal cytosolische Domäne von Mtj1p aus Maus, das C- terminal verkürzt ist. Entsteht durch die Thrombinspaltung von Mtj1pC, das in <i>E. coli</i> synthetisiert wird. Plasmid pGEX-4T-1- MTJ1-c. Dr. Johanna Dudek. Medizinische Biochemie und Mole- kularbiologie, Universität des Saarlandes. (Dudek <i>et al.</i> , 2002)
GST-SRP14	SRP14p aus Maus, N-terminal GST markiert. Synthetisiert in <i>E. coli</i> -BL21. Plasmid pGEX-4T-TEV-SRP14. Dr. Johanna Dudek. Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes.
GST	GST Synthetisiert in <i>E. coli</i> -JM101. Plasmid pGEX-4T-1, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg. Dr. Silvia Hahn- Quintes. Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes

#### II.1.9 Material aus Hundepankreas

#### II.1.9.1 Hundepankreasmikrosomen (RM)

Die in dieser Arbeit verwendete Hundepankreasmikrosomen wurden im Labor von Prof. Dr. Richard Zimmermann im Wesentlichen nach der Methode von (Watts *et al.*, 1983) hergestellt. Diese Vesikel, die aus Hundepankreas gewonnen werden, besitzen die selbe Zusammensetzung, sowohl in deren Membran als auch in ihrem Lumen, wie das raue endoplasmatische Retikulum des Säugers, und repräsentieren von daher ein System, in dem man den Transport von sekretorischen Vorstufenproteine verfolgen kann (Blobel und Dobberstein, 1975c; Watts *et al.*, 1983).

Es wurden sieben Mikrosomen-Chargen auf ihre Prozessierungseffizienz und Transporteffizienz hin getestet. Dafür wurden die Mikrosomen jeweils zu einem *in vitro*-Translationsansatz für die Synthese von ppL zugegeben (siehe II.7.1). Während der Inkubation der Ansätze erfolgte der cotranslationale Transport der ppL-Ketten (siehe Abb. 6)



#### Abb. 6 : Test der Hundepankreasmikrosomen

Ein Translationsansatz mit Retikulozytenlysat Typ II wurde für die Synthese von ppL angesetzt (siehe II.7.1). Es wurde in 8 Aliquots geteilt. Einem wurde Puffer, den restlichen Hundepankreasmikrosomen (7 verschiedene Chargen wurden getestet) zugegeben. Diese Ansätze wurden nun für 60 min bei 30°C inkubiert und anschließend einem Sequestrierungstest unterzogen (siehe II.7.2). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe II.3.2) und mittels Phosphorimaging (siehe II.3.7) analysiert. **A)** Bild nach Phosphorimaginganalyse der Proben. In der Abbildung links, unter "Kontrolle", sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliquots. Rechts, unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots. **B)** Auswertung der Prozessierung in den jeweiligen Hundepankreasmikrosomen. **C)** Auswertung der Transporteffizienz des in die jeweiligen Mikrosomen transportierten [<sup>35</sup>S]-ppL.

Mit einer Prozessierung von etwa 70 % der synthetisierten ppL-Ketten und einer Transporteffizienz von etwa 100 % waren die Hundepankreasmikrosomen der Chargen MW3 und 30.03. die am besten geeigneten für die geplanten Versuche. Es wurde die Charge 30.03 verwendet, da diese das größte Volumen Mikrosomen-Suspension darstellte.

#### II.1.9.2 Puromycin/KCI behandelte RM (PKRM)

Das Waschen der Hundepankreasmikrosomen mit 1 mM Puromycin und 0,5 M KCI erfolgte nach der Methode von Görlich und Rapoport (Görlich und Rapoport, 1993). Die daraus entstehenden PKRM wurden für die Herstellung von Proteoliposomen verwendet (siehe II.5.2).

#### II.1.9.3 Ribosomen

Die für die Ribosomenbindungsversuche und die diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugationen verwendeten Ribosomen stammen aus der Präparation von Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1). Hierbei handelt es sich um die cytosolischen Ribosomen.

### II.2 Molekularbiologische Methoden

#### II.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht, enzymatisch, von bestimmten Nukleotidsequenzen in vitro millionenfach Kopien herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang findet in aufeinander folgenden Zyklen statt und ähnelt dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, sogenannte Primer, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize, der Template-DNA. Weitere Komponenten der PCR sind ein Gemisch aller dNTPs sowie Reaktionspuffer, wobei ausschließlich die vom Hersteller mitgelieferten Lösungen eingesetzt wurden. Als Polymerase wurde das Enzym *Pwo* aus *Pyrococcus wosei* verwendet. Sie zeichnet sich nicht nur durch ihre hohe Thermostabilität, sondern auch durch ihre  $3' \rightarrow 5'$ -Exonukleaseaktivität ("Proof-Reading") aus. So beträgt ihre Fehlerrate ca.  $3.2 \times 10^{-6 \text{ im}}$  vergleich zu 2,6 x  $10^{-5}$  bei der auch oft verwendeten Taq DNA-Polymerase (Barnes, 1994; Steffen, 1999).

Die Sequenz der Primer, synthetische DNA-Oligonukleotide, wird so gewählt, dass sie komplementär zu jeweils Anfang und Endbereichen der zu vermehrenden DNA sind. Mit Hilfe der Primer können auch Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt werden, die später zum Einklonieren in den entsprechenden Expressionsvektor verwendet werden.

Ein PCR-Zyklus lässt sich in drei Abschnitte gliedern:

- 1– Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 30 s.
- 2– Hybridisierung der Primer an der einzelsträngigen Matrizen-DNA ("annealing"). Dieser Schritt erfolgte für 30 Sekunden. Die Temperatur richtet sich nach den gewählten Primern und lässt sich wie folgt berechnen (Suggs *et al.*, 1981):

Schmelztemperatur  $T_m$  = {(Anzahl von A + T) x 2°C + (Anzahlt von G + C) x 4°C} Für Primer die länger als 20 Nukleotide sind, musste die Temperatur korrigiert werden (Sambrook *et al.*, 1989). Bei der Klonierung der PCR-Fragmente für die Herstellung des pIVEXGST-SEC62C wurde eine Temperatur von 50°C gewählt.

3– Synthese des komplementären DNA-Strangs durch die Polymerase ("extension"). Die Zeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Produkts. Es wurde 1 min pro 1000 bp berechnet, wobei immer auf die nächste halbe Minute abgerundet wurde.

Durch mehrfache Wiederholung dieses aus drei Schritten bestehenden Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation. Für Plasmid-DNA als Matrize werden in der Regel jeweils 23 Amplifikationszyklen durchgeführt. In dem Fall der PCR für die Herstellung des Inserts, das im Vektor pIVEXGST einkloniert wurde, wurden 35 Zyklen durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde eine Inkubation für 120 s bei 94°C durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Template-Moleküle einzelsträngig vorliegen. Nach dem letzten Zyklus wird ein zweiminütiger Polymerisationsschritt angeschlossen, um zu ermöglichen, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen. In Abb. 7 ist beispielhaft der Verlauf einer PCR dargestellt.

Ein PCR-Ansatz wurde nach dem folgenden Schema pipettiert:

#### PCR-Ansatz:

10 µl	10 x <i>Pwo</i> -Puffer mit 20 mM MgSO₄
8 µl	25 mM MgSO₄
2 µl	10 mM dNTPs
1 µI	"stromaufwärts" Primer 50 μM
1 µI	"stromabwärts" Primer 50 µM
0,5 µl	Plasmid-DNA (Minipräp-DNA wurde 1:20 mit bidest. H <sub>2</sub> O verdünnt eingesetzt)
0,5 µl	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)
ad. 100 ul	bidest. H <sub>2</sub> O

Die Plasmide, die als DNA-Matrize dienten, sind unter II.1.5 in der Tabelle 1 dargestellt. Die verwendeten Primer sind unter II.1.6 dargestellt.



**Abb. 7 : Verlauf einer Polymerasekettenreaktion.** Erläuterungen: siehe Text.

Nach der PCR wurde ein Aliquot von 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Reaktion zu überprüfen (siehe II.2.4). Bei erfolgreicher Amplifizierung wurde der Rest der DNA des PCR-Ansatzes mit Hilfe des "High Pure PCR Product Purification Kit" gereinigt (siehe II.2.2). Die somit erhaltene DNA wurde in einem weiteren Schritt durch Restriktionsendonukleasen gespalten (siehe II.2.3.1).

### II.2.2 Reinigung der amplifizierten DNA mit dem "High Pure PCR Product Purification Kit"

Diese Reinigung diente zur Entfernung von Nukleotiden, Salzen, der Polymerase und sonstiger Verunreinigungen. Dazu wurde, nach Zugabe von 500 µl Bindungspuffer, der PCR-Ansatz in ein Filtrationsgefäß pipettiert und in der Tischzentrifuge für 30 s bei 14.000 Upm zentrifugiert. DNA wird dabei an den Filter gebunden. Nach dem Entfernen des Durchlaufs wurde der Filter mit 500 µl Waschpuffer gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert, der Durchfluss entfernt, mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und wieder zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 40-50 µl Elutionspuffer eluiert und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (30 s bei 14.000 Upm) in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt.

Die gereinigte DNA wurde nun über Nacht gespalten (siehe II.2.3.1), über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe II.2.4) und zur Ligation (siehe II.2.6) eingesetzt.

<u>Bindungspuffer:</u> 10 mM Tris/HCl, ph 6,6 3 M Guanidin-Thiocyanat 5 % (v/v) Ethanol

Elutionspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 1 mM EDTA <u>Waschpuffer</u>: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 20 mM NaCl 80 % (v/v) Ethanol

### II.2.3 Enzymatische Modifikation von Plasmid-DNA

#### II.2.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die analytischen und präparativen Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgten entsprechend den optimierten Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Enzyme. Die entsprechenden Spaltungen wurden nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt:

	Analytische	Präparative Spaltung			
	Spaltung	Zweck Ligation	Zweck Translokation		
DNA	0,5 – 1 μl (ca. 1 μg)	4 μl Plasmid-DNA (ca. 4 μg) oder 30 μl PCR-Produkt	25 μl Plasmid-DNA (1 μg/μl)		
Enzym	1-2 Enzymeinheiten	10-20 Enzymeinheiten	25 Enzymeinheiten		
Puffer (10x)	1 µl	4 µl	5 µl		
BSA (1 mg/ml)	1 µl	4 µl	5 µl		
H <sub>2</sub> O bidest.	ad. 10 µl	ad. 40 µl	ad. 50 μΙ		

#### Tabelle 4 : Pipettierschema zur Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte durch Inkubation für mindestens 1 h bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur. PCR-Produkte wurden hingegen immer über Nacht bei dieser Temperatur inkubiert, da die Effizienz der Reaktion wesentlich geringer war. Um die Reaktion zu stoppen und sie für eine anschließende Analyse oder Präparation im Agarosegel vorzubereiten wurde  $\frac{1}{5}$  des Volumens DNA-Probenpuffer zugegeben (siehe II.2.4).

#### II.2.3.2 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Bei der kovalenten Verknüpfung von Vektor-DNA-Fragmenten mit Insert-DNA-Fragmenten war es notwendig, die 5'-Enden des Vektors mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) zu dephosphorylieren, da es ansonsten zu einer Religation des Vektors gekommen wäre, die gegenüber der Ligation von Vektor mit Insert begünstigt gewesen wäre.

Nach der Spaltung des Vektors mit Restriktionsendonukleasen wurde zu dem Ansatz 1  $\mu$ l Phosphatase (Stammlösung 1 U/ $\mu$ l) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe ( $\frac{1}{5}$  des Volumens) von DNA-Probenpuffer gestoppt und die DNA über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe II.2.4)

#### II.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

#### - Durchführung analytischer und präparativer Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine Agarosegelelktrophorese durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurden 1,2 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und 120 ml TAE-Puffer (1x) zugegeben. Nach dem Erhitzen in einem Mikrowellengerät ließ sich die Agarose in dem TAE-Puffer lösen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Agarose-Lösung wurde nun in horizontale Flachbettkammern gegossen und ein Kamm eingesetzt, der nach dem Polymerisieren des Gels vor dem Auftragen der Proben entfernt wurde. Das Agarosegel wurde mit der Flachbettkammer in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, mit TAE-Puffer überschichtet und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150-200 mA für 1-2 Stunden durchgeführt. Die DNA-Fragmente konnten auf einem UV-Tisch durch Licht der Wellenlänge 366 nm sichtbar gemacht oder im Image Master<sup>®</sup> VDS fotografiert werden. Neben den Proben wurde jeweils ein 1 kb DNA-Längenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Somit konnten die Größen der analysierten DNA-Fragmente bestimmt werden. Der Längenstandard erlaubte eine Zuordnung der Fragmentgröße in einem Bereich von Ca. 220 bp bis 12.200 bp.

DNA-Probenpuffer (6x): 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 40,0 % (w/v) Saccharose in bidest. H<sub>2</sub>O <u>TAE-Puffer (50x):</u> 40 mM Tris-Acetat, pH 8 1 mM EDTA in bidest. H<sub>2</sub>O

### II.2.5 Elution der DNA aus dem Agarosegel

Nach der präparativen Agarosegelelektrophorese wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und unter dem UV-Licht betrachtet. Die gewünschte Bande wurde dann mit Hilfe eines sterilen Skalpells ausgeschnitten. Dabei ist darauf zu achten, dass die UV-Strahlung möglichst kurz ist, um zu verhindern, dass es zu unerwünschten DNA-Schädigungen kommen kann. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein 2 ml Reagiergefäß mit 0,22 µm Sterilfiltereinsatz ("Spin X") überführt und in der Tischzentrifuge für 15 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Somit konnte die Agarose von der Flüssigkeit, die die DNA enthielt, getrennt werden. Das Volumen des Filtrats wurde nun mit einer Gilson Pipette bestimmt. Der DNA-Lösung wurden  $\frac{1}{10}$ -Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und  $2\frac{1}{2}$ -Volumen 96 % iges Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde auf dem Vortex kräftig gemischt und die DNA über 30 min bei -80°C gefällt. Der Ansatz wurde in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (10 min, 14.000 Upm bei 4°C) und das Pellet mit 150 µl Ethanol 70 % gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 14.000 Upm bei 4°C) wurde das DNA-Pellet in der Speed-Vac-Anlage getrocknet und in TE-Puffer, pH 8,0 gelöst.

<u>TE-Puffer:</u> 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

### II.2.6 Ligation mit T4-DNA Ligase

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Insert) mit einem Vektor erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym katalysierte die Bildung von Esterbindungen zwischen 5'-Phosphat-Gruppen eines DNA-Doppelstranges und freien 3'-OH-Gruppen eines anderen oder auch desselben DNA-Moleküls. In dem Fall, dass die zu verknüpfenden DNA-Stränge an ihren Enden komplementäre DNA-Sequenzen besaßen, wurde die Wahrscheinlichkeit einer Ligation erhöht. Diese Sequenzüberhänge entstanden nach Spaltung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe II.2.3.1). Die Ligationsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Tris/HCI, pH 7,5

Ligationsansatz:	Ligationspuffer (10x):
1 μl Vektor (0,2 μg/μl)	550 mM Tris/HCI, pH
1,5-2 μl Insert (0,2 μg/μl)	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl Ligationspuffer (10x)	100 mM DTT
0,5 μl T4-DNA-Ligase (1U/μl)	10 mM ATP
ad. 10 μl bidest. H <sub>2</sub> O	1 mg/ml BSA

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 25°C inkubiert. Für die anschließende *E. coli*-Transformation wurde je die Hälfte (5 µl) des Ligationsansatzes eingesetzt.

#### **II.2.7** Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

Kompetente E. coli-Zellen (Medizinische Biochemie, Homburg) (100 µl Zellsuspension pro Ansatz) wurden auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA versetzt (5 µl Ligationsansatz bzw. 0,2-0,5 µl "Minipräp"- oder "Midipräp"-DNA). Dann wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, für genau 90 s auf 42°C erwärmt (Hitzeschock; hierbei sollten die Zellen die Plasmid-DNA aufnehmen) und sofort wieder für 60 s auf Eis inkubiert. Zu den E. coli-Zellen wurden 500 µl LB-Medium gegeben und die Suspension wurde für 45 min bei 37°C unter Rollen inkubiert. Sollte der Ansatz (mit dem Zweck einer DNA-Minipräparation) auf eine LB-Platte, mit Antibiotikum (siehe 0), ausplattiert werden (Ligationsansatz), wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge pelletiert, zum Ausplattieren in 50 µl LB resuspendiert und im Brutschrank (Platten überkopf) bei 37°C über Nacht inkubiert. Für eine Übernacht-Kultur (Plamid-DNA) wurde der gesamte 500 µl-Ansatz in die benötigte Menge Medium, mit Antibiotikum (siehe 0), überführt und bei 37°C mit 250 Upm für mindestens 12 h inkubiert.

	Resistenz für	Antibiotikumkonzentration In Kulturmedium/Platten (µg/ml)	Antibiotikum gelöst in	
Plasmid-DNA				
pET1/195	Kanamycin	25	bidest. H <sub>2</sub> O	
pQE-245/399				
pIVEXGSTSec62C	Ampicillin	100	bidest. H <sub>2</sub> O	
pGEXSec62N∆N10		100		
pGEXSEC62N98-180				
Bakterien-Stamm				
BL21	Chloramphenicol	34	EtOH	
JM101	-	-	-	
M15	Kanamycin	25	bidest. H <sub>2</sub> O	

Tabelle 5 : Für die verschiedenen Plasmide und Bakterienstämme verwendete Antibiotika

#### II.2.8 Plasmid-DNA-Minipräparation ("Minipräp")

Die Plasmidisolierung erfolgte nach alkalischer Lyse der Bakterien (modifiziert nach Birnboim und Doly (1979).

Aus einer über Nacht inkubierten LB-Platte (Medizinische Biochemie, Homburg) wurden die entsprechenden Bakterienkolonien, die mit dem Plasmid-DNA transformiert wurden, mit sterilen Zahnstochern gepickt. Damit wurden, pro Kolonie, je 2 ml TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikum (abhängig von den verwendeten Bakterienstämmen und Plasmide) (siehe 0) angeimpft. Dieses wurde über Nacht bei 37°C im Roller inkubiert. Die Zellensuspension wurde in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und anschließend für 15 s bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zellpellet mit 100 µl GTE-Lösung durch vortexen resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl 1 % (w/v) SDS/0,2 M NaOH, das bei mehrmaligen Überkopfdrehen vorsichtig untergemischt wurde. Bei diesem Vorgang wurde die freigesetzte DNA durch NaOH denaturiert. Nach dem Neutralisieren durch Zugabe von 150 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) erfolgte die Extraktion der DNA durch Zugabe von 400 µl PCI-Lösung. Das Gemisch wurde dabei für 30 s auf dem Vortexer gemischt. Bei diesem Schritt präzipitieren die Zellmembranreste chromosomale DNA, RNA und denaturierte Proteine. Durch die nachfolgende Zentrifugation (2 min bei 14.000 Upm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge) werden die Präzipitate abgetrennt. 400-450 µl der oberen wässrigen Phase, die die Plasmid-DNA enthält, wurden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit 1 ml 96 % Ethanol überführt. Durch die Inkubation von 1 min bei Raumtemperatur erfolgt die Fällung der DNA, die anschließend durch Zentrifugation (2 min bei 14.000 Upm und RT in einer Tischzetrifuge) sedimentiert wurde. Das DNA-Pellet wurde mit 750 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (2 min bei 14.000 Upm und RT in einer Tischzentrifuge). Das DNA-Pellet wurde nun in der Speed-Vac getrocknet, mit 50 µl TE-Puffer/RNase A-Lösung (Endkonzentration 50 µg/ml) aufgenommen und erst für 3 min bei 55°C, dann für 30 min bei 37°C inkubiert.

Mittels Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm wurde die Reinheit der isolierten Plasmid-DANN bestimmt (siehe II.2.10). 1 µl des gelösten Plasmids wurde für die anschließenden Kontrollspaltungen mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt, der Rest wurde bei 4°C aufbewahrt.

<u>GTE-Lösung:</u> 50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA

<u>TE-Puffer:</u> 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

TB-Medium:

<u>Kaliumphosphatpuffer (0,89 M, pH 7,49):</u> 23,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 125,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad. 1 l bidest. H<sub>2</sub>O (autoklaviert)

<u>RNase A:</u> 10 mg/ml RNase A 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 15 mM NaCl 15 min bei 100°C im Wasserbad kochen (zur Inaktivierung von DNAsen)

6 g Bacto-Trypton (zur Inaktivierung von DNAsen) 12 g Bacto-Hefe Extrakt 4 ml 50 % Glycerin 450 ml bidest. H<sub>2</sub>O (autoklaviert) nach dem Abkühlen Zugabe von 50 ml Kaliumphosphatpuffer (0,89 M, pH 7,4)

PCI-Lösung = Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1):

125 ml Phenol (TE-Puffer gesättigt), pH 7,9120 ml Chloroform5 ml Isoamylalkohol125 mg Hydrochinolin

#### II.2.9 Plasmid-DNA-Midipräparation ("Midipräp")

Zur Midipräparation wurde der "Jetstar"-Kit der Firma Genomed verwendet. Die DNA wird nach alkalischer Lyse an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden, gewaschen und anschließend von der Säule eluiert.

50 ml LB-Medium (siehe II.4.1) wurden mit einer mit Plasmid transferierten Bakterienkolonie (siehe II.2.7) angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttlerinkubator (250 Upm) bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min im JA-20 Rotor bei 5.000 Upm und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde mit 4 ml Lösung E1 resuspendiert und mit 4 ml Lösung E2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Es wurden 4 ml Lösung E3 zur Neutralisation hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 2°C und 14.000 Upm in einem JA-20 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen, sterilfiltriert (0,2 µm Filtereinheiten) und auf die mit 10 ml Lösung E4 äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 2x 10 ml Lösung E5 erfolgte die Elution der gereinigten DNA mit 5 ml Lösung E6. Das Eluat wurde nun mit 5 ml kaltem Isopropanol gefällt und anschließend für 30 min bei 4°C und 15.000 Upm im JA-20 Rotor zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, das für 10 min bei 4°C und 14.000 Upm zentrifugiert wurde. Nach dem Trocknen des Pellets für 10 min in der Speed-Vac wurde dieses im 100 µl TE-Puffer, pH 8,0 aufgenommen und mittels Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm quantifiziert und die Reinheit bestimmt (siehe II.2.10). Anschließend wurde durch weitere Zugabe von TE-Puffer, pH 8,0 eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

<u>Lösung E1 (Zellresuspendierung):</u> 50 mM Tris/HCI, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A

Lösung E2 (Zelllyse): 200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS Lösung E3 (Neutralisation): 3,1 M KAc/Essigsäure, pH 5,5

<u>Lösung E4 (Äquilibrierung der Säulen):</u> 600 mM NaCl/Essigsäure, pH 5,0 100 mM NaAc 0,15 % Triton X-100 Lösung E5 (Waschen der Säulen): 800 mM NaCl/Essigsäure, pH 5,0 100 mM NaAc Lösung E6 (Elution der DNA): 1250 mM NaCl/HCl, pH 8,5 100 mM Tris

### II.2.10 Quantifizierung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Quantifizierung von DNA in wässriger Lösung erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte der Lösung bei 260 nm. Dabei musste zunächst eine geeignete Verdünnung der Lösung so hergestellt werden, dass die gemessene optische Dichte kleiner als 1,0 war. Mit Hilfe des Literaturwertes von einer optischen Dichte von 1,0 für eine Lösung mit 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989) wurde aus der gemessenen optischen Dichte und dem Verdünnungsfaktor die tatsächliche Konzentration der DNA-Lösung bestimmt. Um zusätzlich eine Aussage über mögliche Verunreinigungen der DNA-Lösung zu erhalten, wurde außerdem die optische Dichte bei 280 nm gemessen und der Quotient aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Bei einer nicht verunreinigten DNA-Lösung entspricht dieser Wert 1,8. Ein niedrigerer Wert als Folge einer höheren optischen Dichte bei 280 nm spricht für eine Verunreinigung durch Proteine, ein höherer Wert hingegen für eine Verunreinigung durch RNA, da diese aufgrund ihres niedrigeren Ordnungsgrades eine höhere optische Dichte bei 260 nm aufweist.

## II.3 Proteinbiochemische Methoden

### II.3.1 Fällung von Proteinen

Zur Verringerung des Auftragsvolumens für SDS-PAGE bzw. zur Entfernung von Salz oder Membranresten wurden die Proben nach folgenden Methoden gefällt:

### – TCA-Fällung

Die zu fällende Probe wurde mit einem Viertel Volumen eiskalter 50 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und für 30 min bei 0°C inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge für 25 min, bei 2°C und 14.000 Upm wurde den Überstand verworfen und dem Pellet 1 ml eiskaltes Aceton zugegeben, um TCA-Reste zu entfernen. Die Probe wurde gevortext und anschließend erneut für 25 min gleicherweise zentrifugiert. Das Pellet wurde in der Speed-Vac für 15 min getrocknet und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen.

#### - Fällung nach Wessel-Flügge

Alle Arbeitsschritte diese Methode (Wessel und Flügge, 1984) werden bei Raumtemperatur durchgeführt. 100 µl der zu fällenden Proteinlösung wurden mit 400 µl Methanol versetzt und gevortext. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Probe wurde erneut gevortext und bei 14.000 Upm in einer Eppendorfzentrifuge für ca. 10 s zentrifugiert. Nach Zugabe von 300 µl bidest. Wasser und kräftigem Vortexen wurde bei 14.000 Upm in einer Eppendorfzentrifuge für 2 min zentrifugiert. Die während der Zentrifugation entstandene obere Phase wurde vorsichtig abgenommen (die Interphase, in der sich die Proteine befinden, sollte intakt bleiben) und verworfen. Weitere 400 µl Methanol wurden zugesetzt und nach kurzem Vortexen wurden die gefällten Proteine durch eine Zentrifugation bei 14.000 Upm für 5 min in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde in der Speed-Vac getrocknet. Nach Zugabe von Lämmli-Probenpuffer und anschließendem Erhitzen bei 95 °C für 5 min wurden die Proteine durch SDS-PAGE (siehe II.3.2) aufgetrennt und weiter analysiert.

#### II.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde eine modifizierte Methode nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet, bei der die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Das anionische Detergens Natriumdodezylsulfat (SDS) bindet, dank seine lipophilen Kohlenwasserstoffkette, an hydrophobe Gruppen eines Proteins, was so zu einer negativen Ladung der Proteine führt (Weber und Osborn, 1969). Dadurch wird die eigentliche Ladung des Proteins maskiert und die SDS-beladenen Proteine werden fast ausschließlich nach ihrer Masse getrennt.

Die SDS-Gele bestehen aus einem kurzem Sammelgel und einem langen Trenngel. Das an Acrylamid niederprozentige Sammelgel dient zur Fokussierung der Proteine. Im Trenngel erfolgt die Trennung nach der Masse der Proteine.

Die Gele wurden nach dem folgenden Pipetierschema gegossen.

Lösungen	Trenngel			Sammelgel
Acrylamidkonzentration	12,5 %	15 %	17,5 %	5 %
40 % (w/v) Acrylamid (ml)	4,69	5,63	6,56	0,6
2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	1,25	1,5	1,76	0,16
bidest. H2O (ml)	2,86	1,67	1,39	3,34
1,875 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	6		-	
1,0 M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)	-			0,6
10 % (w/v) SDS (μl)	150			48
20 % (w/v) AMPS (μl)	45		45	
TEMED (µI)	5		7	
Gesamtvolumen (ml)	15			4,8

#### Tabelle 6 : Gießschema für 14x11x0,1 cm SDS-Polyacrylamid-Gele unterschiedlicher Acrylamid- Konzentrationen

Zur Abdichtung der Gele wurde ein Bodengel aus<br/>2 % (w/v) Agarose gegossen.

Die Acrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße des Gels und wird je nach Größe der Proteine variiert.

Die Proteinproben wurden vor ihrem Auftrag auf das Gel mit Proteinprobenpuffer versetzt, so das ein Endvolumen von 20-30  $\mu$ l in 1x Lämmli-Probenpuffer erreicht wurde. Nach Erhitzen für 5 min bei 95°C, abkühlen der Proben und Zentrifugation für 15 s bei 14.000 UpM in einer Tischzentrifuge wurde die Probe auf 14 x 11 x 0,1 cm Vertikalgele aufgetragen.

Um die Elektrophorese durchzuführen wurden die SDS-Gele auf einer Elektrophoresekammer eingespannt und mit Elektrodenpuffer bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 3 h bei 45 mA oder für ca. 16 h bei 6 mA.

Proteinprobenpuffer (1X): 60 mM Tris/HCI, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerin 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau Elektrodenpuffer: 50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS

### II.3.3 Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine von einer Molekularmasse von weniger als 10 kDa (Präprolaktin86mer) auftrennen zu können, wurden große (33 x 22 x 0,1 cm) 19,4 % SDS-Gele verwendet. Diese wurden mit Harnstoff (6M Endkonzentration) versetzt, der aufgrund seiner hohen Hygroskopizität die Stabilität des Gels verbessert (Ito *et al.*, 1980)

Die folgende Tabelle stellt das Pipettierschema eines Harnstoff-SDS-Geles dar.

Lösungen	Bodengel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidkonzentration	20 %	19,4 %	5 %
Harnstoff (g)	-	27,0	7,2
60 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	-	24,5	1,67
30 % (w/v) Acrylamid / 0,2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	26,7	-	-
H <sub>2</sub> O bidest (ml)	12,6	-	10,4
1,875 M Tris/NaCl, pH 8,8 (ml)	-	30	-
1,0 M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)	-	-	2,5
10 % (w/v) SDS (μl)	400	750	200
20 % (w/v) AMPS (μl)	100	25	10
TEMED (µI)	200	250	100
Gesamtvolumen (ml)	40	75	20

Tabelle 7 : Gießschema für ein 33 x 22 x 0,1 cm Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gel

Proteinprobenpuffer (1X): 60 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerin 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau Elektrodenpuffer: 50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Die Elektrophorese erfolgte für ca. 17 h bei 28 mA.

### II.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten mit Hilfe der Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht werden. Zuerst wurde das Gel für ca. 30 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt. Dabei werden sowohl die im Gel enthaltenen Proteine als auch die Gelmatrix angefärbt. Die Entfärbung der letzteren wurde durch Inkubation für 30 min in Entfärberlösung-1, gefolgt von einer mehrstündigen Inkubation in Entfärberlösung-2, erreicht. Danach wurde das Gel in einer 10 %igen Glycerinlösung etwa für 30 min äquilibriert und zwischen Cellophan getrocknet.

Färbelösung:

0,2 % (w/v) Coomasie-Brilliant-Blue R-250 0,005 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G-250 50 % (v/v) Methanol (techn.) 10 % (v/v) Essigsäure (techn.)

Entfärberlösung-1: 40 % (v/v) Methanol (techn.) 10 % (v/v) Essigsäure (techn.) 2 % (v/v) Glycerin Entfärberlösung-2:

10 % (v/v) Methanol (techn.) 5 % (v/v) Essigsäure (techn.) 2 % (v/v) Glycerin

### II.3.5 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde für eine immunologische Detektion auf eine PVDF-Membran transferiert (Burnette, 1981). Dieser Elektrotransfer wurde alternativ mit Hilfe von zwei verschiedenen Systemen durchgeführt: das "Semi-Dry-Verfahren" für Proteine mit einer Molekularmasse von weniger als 15 kDa, und das "Tank-Blot-Verfahren"

### II.3.5.1 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen nach dem "Semi-Dry-Verfahren"

Dafür wurde den "MilliBlot<sup>™</sup>-Graphite Elektroblotter I"-Apparatur (Millipore) verwendet.

Als erstes wurde die auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran kurz in 100 % Methanol (p.a.) geschwenkt, anschließend drei mal kurz mit destilliertem

Wasser gespült und für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Zunächst wurden die beiden Elektroden der Apparatur mit Transferpuffer gut benetzt. Auf die Anode wurde dann ein in Transferpuffer getränktes, ca. 1 mm dickes Filterpapier aufgebracht (ebenfalls auf Gelgröße geschnitten), auf welches die äquilibrierte PVDF-Membran gelegt wurde. Darüber wurde das SDS-Gel und anschließend wiederum ein gut getränktes Filterpapier gelegt. Nach dem Auflegen der Kathode erfolgte der Elektrotransfer entweder für 3 h bei 150 mA oder über Nacht bei 50 mA (Angaben zur Stromstärke auf eine durchschnittliche Membrangröße von ca. 110 cm<sup>2</sup>).

<u>Transferpuffer</u>: 150 mM Glycin 20mM Tris 20 % (v/v) Methanol

### II.3.5.2 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen nach dem "Tank-Blot-Verfahren"

Dafür wurde die "TRANS-BLOT<sup>™</sup>CELL"-Apparatur (BIO-RAD) verwendet.

Die PVDF-Membran wurde zuerst wie oben beschrieben (siehe II.3.5.1) vorbereitet. Auf die offene dafür bestimmte Plastikhalterung wurden in folgender Reihenfolge, luftblasenfrei übereinander gelegt: einer in Transferpuffer getränkte Schwamm, darüber Filterpapier (Whatman-Papier, in Transferpuffer getränkt), gefolgt von dem zu blottenden SDS-Gel, auf das die PVDF-Membran gelegt wurde, darüber wiederum getränktes Filterpapier und ein getränkter Schwamm. Schwämme und Filterpapier wurden so ausgesucht bzw. zurechtgeschnitten, dass sie die entsprechende Gelgröße hatten. Anschließend wurde die Plastikhalterung geschlossen und in den Blottank so eingesetzt, dass das Gel zur Kathode und die PVDF-Membrane zur Anode gerichtet waren. Der Blottank wurde dann mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte unter Kühlen und Rühren über Nacht bei 400 mA. (Angaben zur Stromstärke auf eine durchschnittliche Membrangröße von ca. 110 cm<sup>2</sup>).

Transferpuffer: 96 mM Glycin 12,4 mM Tris

#### II.3.6 Immunologische Detektion von Proteinen in PVDF-Membranen

Um die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine zu detektieren wurde die Membran direkt nach Beendigung des Elektrotransfers zunächst für 60 min bei Raumtemperatur in Blocklösung geschwenkt. Dies dient zur Absättigung der unspezifischen Bindungstellen an der Membran. Anschließend wurde die Membran mit der Lösung (entsprechende Verdünnung in Blockierlösung, siehe II.1.4) des entsprechenden Primärantikörpers für 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Vor und nach der nun folgenden Inkubation (unter Schwenken) mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000 in Blockierlösung, gekoppelt mit Peroxidase) für 60 min bei Raumtemperatur wurde die Membran nach dem folgenden Schema gewaschen:

2 min in TBS

2 x 5 min in TBST

#### 2 min in TBS

Die immunologische Detektion von Proteinen auf der PVDF-Membran beruhte darauf, dass der Primärantikörper in dem ersten Schritt sein entsprechendes Antigen auf der Membran erkennt. Danach wird wiederum der Primärantikörper von dem Sekundärantikörper erkannt. Dieser Antigen/Antikörper/Antikörper-Komplex lässt sich durch die Peroxidaseaktivität der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase nachweisen. Dazu wurde die Membran nach dem letzten Waschschritt mit dem ECL ("enhanced chemiluminescence)-Detektionssystem (Amersham) inkubiert. Dazu wird die Membran in einem 1:1-Gemisch der beiden Detektionslösungen 1 und 2 für 1 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wird die in Detektionslösung getränkte Membran zwischen zwei Folien gelegt. Die entstandene Chemilumineszenz konnte mit Hilfe von unterschiedlich lange exponierten Röntgenfilmen (1 s - 30 min) sichtbar gemacht werden.

#### TBS-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,4 0,9 % (w/v) NaCl

<u>Blocklösung:</u> 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer Antikörperlösung:

1-2 ‰ (v/v) Antiserum in Blocklösung (je nach Antikörpertiter) (siehe II.1.4)

<u>TBST-Puffer:</u> 0,05 % (w/v) Triton -100 in TBS-Puffer

### II.3.7 Phosphorimaging

Zur Detektion von radioaktiv-markierten Proteinen ([ $^{35}$ S]-Methionin, siehe II.6.2.1), die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt waren (siehe II.3.2, wurde Phosphorimaging angewandt. Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel zur Fixierung der Proteine für 15 min bei Raumtemperatur in Entfärberlösung geschwenkt. Zur Neutralisation wurde das Gel dann 30 min bei Raumtemperatur in Neutralisationslösung unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier gelegt und mit Folie gedeckt und bei 90 °C unter Vakuum getrocknet. Zur Detektion radioaktiver Zerfallssignale durch Phosphorimaging wurde das getrocknete Gel auf eine Exponierplatte (Storage Phosphor-Screen, Molecular Dynamics) gelegt und bei Raumtemperatur unterschiedlich lang exponiert (wenige h – 10 Tage). Die Exponierplatte wurde dann im Phosphorimager<sup>TM</sup> –SF (Molecular Dynamics) ausgewertet.

Neutralisationslösung:
50 % (v/v) Methanol
2 % (v/v) Glycerin
48 % (v/v) dest. H <sub>2</sub> O

### II.3.8 Densitometrie und Image-Quant-Software

Die Methode der Densitometrie wurde zur Quantifizierung von Proteinbandenintensitäten nach verschiedenen Detektionsverfahren genutzt. Es konnten sowohl mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbte Proteinbanden (siehe II.3.4) als auch Bandenschwärzungen auf Röntgenfilmen (immunologische Detektion, siehe II.3.6) quantifiziert werden. Zur Quantifizierung von Bandenintensitäten wurden die entsprechenden Gele oder Röntgenfilme mit Hilfe des "Personal-Densitometers" (Molecular Dynamics) gescannt, mit der Image-Quant-Software (Version 3.30) quantifiziert und als relative Proteinmenge wiedergegeben. Bei dieser Methode wurde darauf geachtet, dass die auszuwertende Bandenintensität sich in einem linearen Bereich befand.

Mit Hilfe der Image-Quant-Software ließen sich auch Signale durch radioaktiven Zerfall auf Exponierplatten nach dem Phosphorimaging (siehe II.3.7) visualisieren und quantifizieren. Die Darstellung von densitometrisch ausgewerteten Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe des Photoshop-Programms (Version 3.0)

### II.3.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

### - Proteinkonzentrationsbestimmung mittels OD<sub>280</sub>

Bei der Wellenlänge von 280 nm besitzen die aromatischen Reste der Aminosäuren ein Absorptionsmaximum. Bei einer bekannten Proteinsequenz ergibt sich aus der Anzahl der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsfaktor AF. Der AF wurde mit Hilfe der Software von Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, USA) bestimmt. Anhand dieses Faktors lässt sich die Konzentration eines gereinigten Proteins bestimmen: Konzentration [mg/ml] =  $OD_{280} \times AF$ 

### - Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford diente zur Abschätzung von Proteinmengen in Eluaten nach Affinitätschromatographie (siehe II.4.3 ;II.4.4 und II.4.5). Dazu wurden 790  $\mu$ I (bzw. 800  $\mu$ I für den Leerwert) H<sub>2</sub>O bidest. und 200  $\mu$ I Bradford-Reagens (BioRad Protein Assay) in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt und mit 10  $\mu$ I der zu vermessenden Probe vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte bei 595 nm. Die dabei erhaltenen Werte wurden mit den Werten einer Eichkurve verglichen, die mit einer in gleicher Weise angesetzten Messreihe mit verschiedenen Verdünnungen einer BSA-Lösung bekannter Konzentration erstellt wurde.

#### - Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Densitometrie

Bei dieser Methode wird das zu quantifizierende Protein mit verschiedenen Mengen einer BSA-Stammlösung auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach der Coomassie-Färbung des Gels wird die Intensität der Blaufärbung beide Proteine über Densitometrie (siehe II.3.8) quantifiziert und miteinander verglichen.

#### II.3.10 Nachweis von biotinylierten Proteinen

Zum Nachweis von biotinylierten, *in vitro*-synthetisierten Proteinen (siehe II.6.2.2) wurde das BM Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin/Streptavidin) (Roche Diagnostics) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine (siehe II.3.2) wurden nach dem Semi-Dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe II.3.5.1). Anschließend wurde die Membran für 40-60 min unter Schwenken mit Blocklösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 30 min unter Schwenken mit der Streptavidin-Peroxidase-Lösung, gefolgt von vier Waschschritten für jeweils 10 min mit Waschlösung unter Schwenken. Zur Visualisierung von Peroxidase-Signalen wurde die Membran für 1 min in Detektionslösung geschwenkt, anschließend in Plastikfolie eingelegt, bevor mit Hilfe eines Röntgenfilmes entsprechende Chemilumineszenzsignale dokumentiert werden konnten. Die verwendete Detektierlösung wurde aus den beiden im Testkit enthaltenen Lösungen frisch angesetzt und musste vor Gebrauch für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Detektion von biotinylierten Proteinen auf der PVDF-Membran beruhte darauf, dass Streptavidin Biotin sehr stark binden kann. Die Biotin/Streptavidin-Komplexe lassen sich durch die Peroxidaseaktivität der an der Streptavidin gekoppelten Peroxidase nachweisen.

#### Maleinsäurelösung:

100 mM Maleinsäure/NaOH, pH 7,5 150 mM NaCl

<u>Blocklösung:</u> Maleinsäurelösung + 2 % (w/v) Blockreagenz (Testkit, lyophilisiert)

<u>Streptavidin-Peroxidase-Lösung:</u> 1 % (w/v) Blockreagenz + 0,2 U/ml Streptavidin-Peroxidase in Maleinsäurelösung <u>Waschlösung:</u> 0,05 % (w/v) Triton X-100 in Maleinsäurelösung

Detektionslösung: 2 ml Detektionslösung A (Testkit) + 20 µl Detektionslösung B (Testkit)

#### II.3.11 Analyse von Protein/Protein-Interaktionen ("pulldown"-Versuch)

Der Bindungsversuch in Lösung oder auch "pulldown"-Versuch genannt, dient der *in vitro*-Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen. Im Rahmen der Arbeit mit Sec62p wurde eine mögliche Interaktion des N- (Sec62N-His<sub>6</sub>) und C-Terminus (GST-Sec62C) in Lösung untersucht. Da beide Proteine als His<sub>6</sub>-Fusions vorlagen, wurde der GST-"tag" des Sec62C für die Bindungsstudie verwendet und somit GSH-Sepharose als Säulenmaterial eingesetzt.

Pro Ansatz wurden 50 µl GSH-Sepharose-Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und dort 3-mal mit Puffer-100 (siehe II.8) gewaschen, indem jeweils 200 µl Puffer-100 zugegeben, kurz zentrifugiert (5 s, 14.000 Upm, RT) und der Puffer im Überstand entfernt wurde. Anschließend wurde die GSH-Sepharose in 50 ml Puffer-100 aufgenommen. Es wurden drei verschiedene Reaktionsansätze pipettiert: der erste enthielt Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-Sec62C der zweite enthielt nur das Sec62N-His<sub>6</sub> und der dritte nur das GST-Sec62C, allen Dreien wurde eine entsprechende Menge an cMV500-Puffer und Puffer-100 (siehe II.8) zugegeben, um eine Endkonzentration von KCI von 110 mM und ein Endvolumen von 610 µl zu erreichen. Die Ansätze wurden für 30 min unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert und zum zuvor vorbereiteten Säulenmaterial zugegeben. Es schließt sich eine Inkubation für 1 h bei 4°C unter Rollen an. Die Ansätze wurden nun für 5 s bei 14.000 Upm und RT zentrifugiert, die Überstände abgenommen und das Protein mit TCA gefällt (siehe xxx), die Pellets wurden mit 100 µl Puffer-100 gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Überstände wurden wieder abgenommen und verworfen und die Pellets mit 30 µl Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Mit allen Proben (Pellets sowie gefällte Überstände) wurde SDS-PAGE durchgeführt, die mittels Coomassie-Färbung analysiert wurde.

#### II.3.12 Konzentration von Proteinlösungen

Um Proteine schonend und schnell zu konzentrieren wurde die Methode der Ultrafiltration verwendet. In Tabelle 8 sind die verwendeten Konzentratoren aufgeführt. Die Konzentration der Proteinlösungen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

57

Konzentrator	Maximales Volumen	Ausschlussmasse der Membran	Maximal zentrifugiert (bei x g)
Centricon YM-30	2 ml	30 kDa	5.000
Centricon YM-10	2 ml	10 kDa	5.000

#### Tabelle 8 : Verwendete Konzentratoren

### **II.4** Synthese und Reinigung von Fusionsproteinen

### II.4.1 Expression von Fusionsproteinen in E. coli

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die cytosolische N-terminale Domäne von Sec62p (Sec62N) als auch zwei verkürzte Formen dieser Domäne (Sec62NΔN10 und Sec62N98-180) als His<sub>6</sub>-Fusion Proteine in *E. coli* synthetisiert, wobei das His<sub>6</sub>-Peptid sich immer am C-Terminus befand. Die cytosolische C-terminale Domäne von Sec62p (Sec62C) wurde im RTS 500 System als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein synthetisiert (siehe II.4.2). Der Fremdproteinteil dient zur Aufreinigung des gewünschten Proteins aus dem Gesamtlysat der Bakterien. Das His<sub>6</sub>-Peptid bindet mit hoher Affinität und Spezifizität an Ni-NTA-Agarose. Für jedes Protein wurden zunächst in kleinen Ansätzen die optimalen Synthesebedingungen bezüglich der Wahl der Bakterienstämme, der Temperatur während der Synthese und der Dauer der Synthese festgestellt.

In der Abb. 8 sind schematisch die in dieser Arbeit hergestellten His<sub>6</sub>- und GST-Fusionsproteine dargestellt. Es sind Derivate des Proteins Sec62p. Die verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 1 unter II.1.5 aufgelistet.



# Abb. 8 : Schematische Darstellung des humanen Sec62p und der als His $_6$ - bzw. GST-Fusion hergestellten rekombinanten Proteine

Die als  $His_{6}$ - bzw. GST-Fusionen hergestellten Derivate von Sec62p sind grau unterlegt. **AA** = Aminosäure; **TM** = Transmembrandomäne; **L** = luminale Domäne

In einem ersten Schritt wurde das entsprechende Plasmid, das für das zu reinigende Protein kodierte, in E. coli-Zellen transformiert (siehe II.2.7). Mit dem Transformationsansatz wurde eine Übernachtkultur in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37°C auf dem Rotationsschüttler bei 250 Upm inkubiert. Die Übernachtkultur wurde am nächsten Morgen in LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikumgehalt (siehe 0 unter II.2.7), 1:20-1:50 verdünnt. Die Zellen wurden bei 37°C auf dem Rotationsschüttler bei 20 Upm weiter inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5-1 erreicht wurde. Nun wurde durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) in einer Konzentration von 72 mg/l (entspricht 0,3 mM) die Expression des unter der Kontrolle des lac-Promotors stehenden Gens induziert. Die Induktions-Temperatur wurde für das entsprechende Protein optimiert. Dafür wurden zwei verschiedene Temperaturen getestet: 37°C als Standardtemperatur und eine niedrigere Temperatur, 30°C, die im Fall von Problemen bei der Synthese, wie Abbau, Anreicherung in cytoplasmatischen Einschlüssen ("inclusion bodies") oder Unlöslichkeit als Folge falscher Faltung, für eine bessere Qualität des Proteins (trotz geringerer Menge) sorgen sollte. Die Dauer der Synthese wurde zwischen 1h und 2,5 h variiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 4°C für 10 min (JA-10 Rotor) geerntet und anschließend in einem für die weitere Reinigung des Proteins geeigneten Puffer aufgenommen (PBS/KM-Puffer bei GST-Fusionsproteinen und Lysepuffer bzw. Puffer A bei His<sub>6</sub>): die Zellen aus 0,5 bis 2 l *E. coli* Kultur wurden in 35 ml Puffer resuspendiert und in 50 ml Plastikröhrchen überführt.

Der Zellaufschluss erfolgte bei den *E. coli* Stämmen JM101 und M15 durch Ultraschallbehandlung: dreimal 1 min bei 40 % Amplitude (VCX Macrotip), wobei das Lysat ständig auf Eis gekühlt wurde und zwischen jeder Beschallung jeweils 5 min Abkühlzeit eingehalten wurde. Bei den BL21-Zellen erfolge die Lyse durch Einfrieren der Zellen bei -80°C für mindestens 3 h und anschließendes Auftauen mit 10 min Inkubation auf Eis, wobei das lysozymähnliche Protein aktiviert wurde. Nach der Lyse wurden die Membranfragmente und die DNA aus dem Lysat durch Zentrifugation abgetrennt. Die Bedingungen hierfür waren von der Art der vorangegangenen Lyse abhängig:

Ultraschall: 30 min, 20.000 Upm, 4°C, Zentrifuge J2-MC, JA-20 Rotor. Einfrieren/Auftauen: 60 min, 50.000 Upm, 4°C, L80 Ultrazentrifuge, Ti70 Rotor. Sollte der Überstand nach der Zentrifugation nicht komplett klar sein, so wurde er, um alle übrigen unlöslichen Bestandteile zu entfernen, durch einen 0,22 µm-Filter filtriert. Das so gewonnene Lysat wurde entweder für die Reinigung des Proteins eingesetzt (siehe II.4.3) oder bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

<u>LB-Medium:</u>		
10 g Bacto-Trypton		
5 g Bacto-Hefe Extrakt		
10 g NaCl		
in 1 I bidest. H <sub>2</sub> O gelöst		
autoklaviert		

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 300 bzw. 500 mM KCl 0 bzw. 0,65 % CHAPS 1 mM β-Mercaptoethanol 10 mM Imidazol pH auf 8 eingestellt sterilfiltriert PBS/KM-Puffer: 1x PBS (10x) 3 mM KCl 1 mM MgCl<sub>2</sub> in bidest.H<sub>2</sub>O sterilfiltriert

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM KCl 0,65 % CHAPS 1 mM β-Mercaptoethanol 20 mM Imidazol pH auf 8 eingestellt sterilfiltriert <u>PBS-Puffer (10x):</u> 1,5 M NaCl 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in bidest.H<sub>2</sub>O pH auf 7,3 eingestellt sterilfiltriert

## II.4.2 *In vitro*-Synthese von Proteinen in *E. coli*-Lysaten: Rapid Translation System 500 *E. coli* High Yield (RTS500)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cytosolische C-terminale Domäne von Sec62p als GST Fusionsprotein (GST-Sec62C; siehe II.1.8) in dem Rapid Translation System 500 (RTS500) der Firma Roche synthetisiert. Bei diesem System wird eine gekoppelte *in vitro*-Transkription und *in vitro*-Translation durchgeführt. Die Reaktion erfolgt in einem speziellen Reaktor, der in einen Reaktionsraum und einen Nährstoffraum mittels einer semipermeablen Membran unterteilt ist. Über die Membran werden Nährstoffe und Nebenprodukte der Proteinsynthese während der Synthese ständig ausgetauscht, was die Syntheserate des Proteins deutlich steigert. Dieses zellfreie System zeichnet sich durch eine hohe Proteinsyntheserate (Maurer *et al.*, 2003) aus. Für eine Proteinsynthese im RTS-System wurde zunächst die entsprechende DNA in einen für das System optimierten Vektor (pIVEXGST) einkloniert. Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (GST), mit der das zu synthetisierende Protein fusio-

niert wird und das zur Aufreinigung des gewünschten Proteins aus dem Gesamtlysat dient. Die Affinitätsmatrix für GST-Fusionsproteine besteht aus Glutathion-Sepharose (GSH-Sepharose).

Für eine Reaktion wurden eine Nährstofflösung und eine Reaktionslösung nach folgendem Schema pipettiert:

<u>Nährstofflösung:</u>	Reaktionslösung:
8 ml Feeding Mix	0,525 ml <i>E. coli</i> -Lysat
2,65 ml Aminosäure Mix ohne Methionin	0,225 ml Reaktion Mix
0,3 ml Methionin-Lösung	0,27 ml Aminosäure Mix ohne Methionin
	30 µl Methionin-Lösung
	15 μl Plasmid-DNA (1 μg/μl)

Beide Lösungen wurden in die jeweiligen Räume des Reaktorgefäßes eingefüllt. Der Reaktor wurde nun in einen speziellen Inkubator eingesetzt, wo die Reaktion für 24 h bei 30°C erfolgte. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktionslösung aus dem Reaktor pipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt.



Abb. 9 : Synthese von GST-Sec62C in dem RTS500-System

Das Plasmid PIVEXGST-SEC62C wurde für die Synthese von GST-Se62C im RTS 500 System verwendet. Nach der Synthese wurden 10 µl der Reaktionslösung zentrifugiert. Überstand (ÜS) und Pellet (P) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung analysiert. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte durch Affinitätschromatographie mit GSH-Sepharose (siehe II.4.5 und Abb. 13).

Um den Erfolg der Reaktion zu prüfen, wurden 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie für 15 s bei 14.000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig entnommen und mit Lämmli-Probenpuffer gemischt. Das Pellet wurde ebenfalls in Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Beide Proben wurden durch SDS-PAGE (siehe II.3.2) mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (siehe II.3.4 und Abb. 9).

#### II.4.3 Analytische Affinitätschromatographie

Bei der hier verwendeten Affinitätschromatographie handelt es sich um eine Methode mit der Proteine die ein bestimmtes Fremdprotein oder -peptid in ihrer Sequenz enthalten und daher als Fusions- oder Rekombinatproteine bezeichnet werden, von anderen Proteinen, die dieses Merkmal nicht besitzen, getrennt werden können. Der Fremdprotein- bzw. -peptidteil des zu trennenden Proteins wird als Markierung oder "Tag" bezeichnet und hat eine große Affinität und Bindungskapazität für eine entsprechende Matrix. Somit kann man an diese Matrix gebundene Proteine von den ungebundenen Proteinen trennen. In dieser Arbeit wurden als "Tag" His<sub>6</sub> Peptide bzw. Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet. Die ersten haben als Matrix Ni-NTA-Agarose, die zweiten Glutathion-Sepharose (GSH-Sepharose).

Nach der Synthese in E. Coli bzw. in dem RTS 500-System wurden zunächst die Qualität der synthetisierten Proteine sowie die Isolierungsbedingungen in einem Bindungsversuch getestet. Hierzu wurden 30 µl Ni-NTA-Agarose- bzw. 50 µl GSH-Sepharose-Suspension entweder mit dem Puffer, in dem die Bakterien aufgeschlossen wurden (für His<sub>6</sub>-Fusionen) oder mit PBS/KM (für GST-Fusionsproteine), 3 mal gewaschen und anschließend mit 100 µl bzw. 20 µl (für Ni-NTA-Agarose bzw. GSH-Sepharose) Lysat für 1 h bei 4°C unter Rollen in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation für 10 s bei 14.000 Upm in der Eppendorfzentrifuge bei Raumtemperatur sedimentiert und der Überstand ("Durchfluss") abgenommen. Das Säulenmaterial wurde nun 3-mal mit 1 ml Waschpuffer (bei His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen) oder PBS/KMT-Puffer (bei GST-Fusionsproteinen) gewaschen. Jedem Waschschritt folgte eine Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen, der Überstand wurde jeweils verworfen. Die an die Ni-NTA-Agarose bzw. GSH-Sepharose gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 30 µl Proteinprobenpuffer und Inkubation für 5 min bei 95°C eluiert. Es folgte eine Analyse der Proben durch SDS-PAGE (siehe II.3.2) und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue (siehe II.3.4).

62
Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 300 bzw. 500 mM KCl 0 bzw. 0,65 % CHAPS 1 mM β-Mercaptoethanol 20 mM Imidazol in bidest. H<sub>2</sub>O pH auf 8 eingestellt sterilfiltriert

PBS-Puffer (10x):

1,5 M NaCl 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in bidest. H<sub>2</sub>O pH auf 7,3 eingestellt sterilfiltriert PBS/KM-Puffer: 1x PBS (10x) 3 mM KCl 1 mM MgCl<sub>2</sub> in bidest. H<sub>2</sub>O sterilfiltriert PBS/KMT-Puffer: 1x PBS (10x) 3 mM KCl 1 mM MgCl<sub>2</sub> 0,1 % (v/v) Tween20 in bidest. H<sub>2</sub>O sterilfiltriert

#### II.4.4 Reinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen in präparativem Maßstab

Die Isolierung großer Mengen rekombinanter Proteine folgte dem oben beschriebenen Prinzip der Affinitätschromatographie, geschah jedoch entweder in 20 ml-Chromatographiesäulen mit Bettvolumina ("disposable chromatography columns") an Ni-NTA-Agarose von 3 ml, oder an His Trap<sup>™</sup> HP 5 ml Säulen mit Hilfe der "Äkta Prime", das eine Imidazolgradientenelution erlaubte. Bei beiden Arbeitsmethoden erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4°C.

Bei der Affinitätschromatographie mittels "disposable chromatography columns" wurde das Säulenmaterial mit 2 x 20 ml des entsprechenden Lysepuffers äquilibriert. Die Inkubation des Zelllysates mit der Ni-NTA-Agarose erfolgte in einem 50 ml-Plastikröhrchen auf einem Roller für 1,5 h. Anschließend wurde das Gemisch in die unten geschlossene Chromatographiesäule überführt, mit einer Fritte oben verschlossen, unten geöffnet und 2 mal mit 1 Bettvolumen Waschpuffer gewaschen. Die darauf folgende Elution des Proteins erfolgte in der Regel mit 8 ml His<sub>6</sub>-Elutionspuffer in 1 ml-Schritten. Die Fraktionen, die das eluierte Fusionsprotein enthielten, wurden mit Hilfe der Bradford-Methode ("BioRad Protein Assay") analysiert. Abb. 10 zeigt die Synthese und Reinigung des Sec62N- His<sub>6</sub> mittels "disposable chromatography columns".

63

Bei der Affinitätschromatographie mittels "Äkta Prime" wurde, nach dem Waschen (mit 10,1 ml Puffer B) und Äguilibrieren (mit 19,9 ml Puffer A) der Schläuche der "Äkta Prime", eine His Trap<sup>™</sup> HP 5 ml Säule mit 20 ml Puffer A äquilibriert. Das in Puffer A aufgenommene Lysat wurde mit Puffer A auf 70 ml aufgefüllt und auf die Ni-Säule aufgetragen. Messzylinder, in dem sich das Lysat befunden hatte, und Schläuche, über die das Lysat aufgetragen wurde, wurden dann mit 10 ml Puffer A nachgespült. Es folgte einen Waschschritt mit 30 ml Puffer A um ungebundene Proteine von der Säule zu waschen. Anschließend wurde über 30 ml der Anteil von Puffer B kontinuierlich von 0 % auf 100 % erhöht, was einem Imidazol-Gradienten von 20 mM auf 250 mM Imidazol entsprach. Dann wurde die Elution des Proteins mit weiteren 10,1 ml Puffer B fortgesetzt. Ab dem Beginn des Gradienten wurde der Durchlauf durch die Säule in 1 ml-Fraktionen gesammelt, der Proteingehalt der Fraktionen durch kontinuierliche Messung der optischen Dichte der Lösung bei 280 nm bestimmt und in einem Elutionsprofil aufgezeichnet. Nach der Elution wurden das Säulenmaterial mit 9,9 ml Puffer A reäguilibriert und anschließend die Schläuche erst mit 20 ml Puffer A dann mit 20 ml bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Mit Hilfe des Elutionsprofils konnten am Ende des Laufes direkt die proteinenthaltenden Fraktionen ermittelt werden. Abb. 11 und zeiget die Reinigung von Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> und Sec62N98-180-His<sub>6</sub> mittels "Äkta Prime".

Nach der Elution der Proteine (mittels "disposable chromatography columns" bzw. "Äkta Prime") wurden die Fraktionen, die das eluierte Protein enthielten, über eine PD10-Säule in den für die späteren Versuche benötigten Puffer (MV-Puffer, MV500-Puffer, cMV-Puffer, cMv500-Puffer) gebracht (siehe II.4.6), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Umpufferung diente u.a. der Entfernung des Imidazols, das beim Wiederauftauen mit dem Protein ausfallen kann.

Lysepuffer:	Waschpuffer:
50 mM Tris/HCl, pH 8,0	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
300 bzw. 500 mM KCl	300 bzw. 500 mM KCI
0 bzw. 0,65 % CHAPS	0 bzw. 0,65 % CHAPS
1 mM β-Mercaptoethanol	1 mM β-Mercaptoethanol
10 mM Imidazol	20 mM Imidazol
pH auf 8 eingestellt	in bidest. H <sub>2</sub> O
sterilfiltriert	pH auf 8 eingestellt
	sterilfiltriert

<u>His<sub>6</sub> -Elutionspuffer:</u>	<u>Puffer A:</u>	<u>Puffer</u>
50 mM Tris/HCl, pH 8,0	50 mM Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
300 bzw. 500 mM KCl	500 mM KCI	500 ml
0 bzw. 0,65 % CHAPS	0,65 % CHAPS	0,65 %
1 mM β-Mercaptoethanol	1 mM β-Mercaptoethanol	1 mM (
250 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 ml
in bidest. H <sub>2</sub> O	in bidest. H₂O	in bide
pH auf 8 eingestellt	pH auf 8 eingestellt	pH auf
sterilfiltriert	sterilfiltriert	sterilfil

<u>Puffer B:</u> 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM KCl 0,65 % CHAPS 1 mM β-Mercaptoethanol 250 mM Imidazol in bidest. H<sub>2</sub>O pH auf 8 eingestellt sterilfiltriert

<u>MV-Puffer :</u> 20 mM HEPES 50 mM KCI 200 mM Saccharose 2 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT in bidest. H<sub>2</sub>O MV500-Puffer : 20 mM HEPES 500 mM KCI 200 mM Saccharose 2 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT in bidest. H<sub>2</sub>O

<u>cMV-Puffer :</u> 20 mM HEPES 50 mM KCI 200 mM Saccharose 2 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT 0,65 % CHAPS in bidest. H<sub>2</sub>O cMV500-Puffer :

20 mM HEPES 500 mM KCI 200 mM Saccharose 2 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT 0,65 % CHAPS in bidest. H<sub>2</sub>O



#### Abb. 10 : Synthese und affinitätschromatographische Reinigung von Sec62N-His<sub>6</sub>

Die Kultivierung von E. coli BL21-Zellen mit dem pET1/195 Plasmid erfolgte bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,55 bei 600 nm, dann wurde die Synthese des Sec62N-His<sub>6</sub> durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 M) induziert und die Zellen für 2 h weiter bei 37°C kultiviert. Nun wurde die Kultur in vier Aliquots geteilt. Es wurden nun vier Zelllysate hergestellt, die sich voneinander in der KCI- und CHAPS-Konzentration unterschieden. Aus jedem Lysat wurde das Sec62N-His<sub>6</sub>, mittels Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose isoliert, wobei bei jedem Schritt (Äquilibrierung und Waschen des Säulenmaterials und anschließende Elution) die entsprechende Salz/CHAPS-Bedingungen eingehalten wurden. Die Eluate wurden, je nach Salz/CHAPS-Bedingung, mittels PD-10 Säulen umgepuffert, wobei im neuen Puffer die entsprächende Salz/CHAPS-Bedingungen eingehalten wurden. Nach der SDS-PAGE-Analyse der PD-10 Fraktionen wurden die höher konzentrierten Fraktionen (unter 500 mM KCI +/- CHAPS-Bedingungen) jeweils vereinigt und die Fraktionen mit der niedrigen KCI-Konzentration jeweils aufkonzentriert. Die genaue Konzentration der jeweiligen "Pools" sowie der Konzentrate wurden mittels Densitometrie (siehe II.3.9) ermittelt. (Daten nicht gezeigt). A) Vor und nach der Induzierung mit IPTG wurden Kultur-Stichproben entnommen. Bei der affinitätschromatographische Reinigung des Proteins wurden sowohl von den Durchflüssen als auch von den Eluaten, von allen vier Bedingungen, Proben entnommen. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. B) Nach der Umpufferung mittels PD-10 Säule wurde die Konzentration der Eluate mittels OD<sub>280</sub> gemessen. Von den am höchsten konzentrierten Fraktionen wurden Proben entnommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung analysiert.



# Abb. 11 : Synthese und affinitätschromatographische Reinigung von Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub> und Sec62N98-180-His<sub>6</sub>

Die Kultivierung von *E. coli* JM101-Zellen mit dem pGEX-SEC62N $\Delta$ N10 bzw. pGEX-SEC62N98-180 Plasmid erfolgte bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 1 bei 600 nm (OD<sub>600</sub>), dann wurde die Synthese der jeweiligen Proteine durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 M) induziert und die Zellen für 1,5 h weiter bei 37°C kultiviert. Nun wurde jeweils ein Gesamtzelllysat hergestellt und aus diesem mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (mit der "Äkta Prime"), Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub> bzw. Sec62N98-180-His<sub>6</sub> gereinigt. Die Proteine wurden jeweils mit einem Imidazolgradienten eluiert und in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Während der Elution wurde die OD<sub>280</sub> des Eluates aufgezeichnet (**A**, **C**). Von den Elutionsfraktionen wurden Proben entnommen, diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert (**B**, **D**). Bei jedem Schritt (Zelllyse, Äquilibrierung und Waschen des Säulenmaterials und anschließende Elution) enthielt der entsprechende Puffer eine KCI-Konzentration von 500 mM und 0,65 % (v/w) CHAPS. Anschließend wurden die Eluate (Fraktionen 18-22 für Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub> bzw. 6-20 für Sec62N98-180-His<sub>6</sub>) in cMV500-Puffer mittels PD-10 Säulen umgepuffert (siehe II.4.6).

# – Stabilität in der Lösung und Sensibilität auf das Einfrieren-Wiederauftauen des Sec62N-His<sub>6</sub>

Um die Eigenschaften von Sec62p, was eine mögliche Interaktion mit Ribosomen sowie die Beeinflussung der Proteinsynthese betrifft, zu untersuchen, wurde die N-terminale cytosolische Domäne gewählt (siehe III.2). Dass das Produkt einer ersten Sec62N-His<sub>6</sub>-Präparation in nacheinander folgenden Versuche jedes Mal einen schwächeren Effekt zeigte (es wurde die Bindung an Ribosomen sowie der Effekt auf die in vitro-Synthese eines Proteins untersucht (Daten nicht gezeigt), ließ den Schluss zu, dass dieses Protein durch das Verfahren des Einfrierens und Wiederauftauens der Lösung, in der es aufgenommen war, beeinträchtigt worden war (Daten nicht gezeigt). Auf diesem Grund wurde eine neue Präparation durchgeführt und vier verschiedene Puffer-Bedingungen bei der Reinigung des Proteins getestet: 500 mM KCl bzw. 50 mM KCl +/- Detergens (CHAPS) (siehe Abb. 10). Nach der Umpufferung des Proteins, wobei Salz- und CHAPS-Bedingungen eingehalten wurden, wurde die Stabilität in der Lösung und Sensibilität auf das Einfrieren-Wiederauftauen des gereinigten Proteins getestet. Dafür wurde von den vier Sec62N-His<sub>6</sub>-Stammlösungen ein Aliquot zentrifugiert, um aggregierte Proteine abzutrennen. Die Überstände wurden zweimal hintereinander schockgefroren und wiederaufgetaut, dann wieder zentrifugiert, um erneut aggregiertes Protein zu pelletieren. dasselbe Volumen sowohl der frischen Stammlösungen als auch der Überstände beider Zentrifugationen wurde auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert. In der Abb. 12 A ist das Ergebnis dieser Analyse wiedergegeben. Die Bandenintensitäten wurden mit der Image-Quant-Software densitometrisch ausgewertet und in der Abb. 12 B in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

Sec62N-His<sub>6</sub> in der Lösung mit Standard-Bedingungen, d. h. bei niedriger Salzkonzentration und ohne Detergens, zeigte eine Unlöslichkeit von etwa 20 % (Balken 2). Dagegen war die Stabilität des gereinigten Sec62N-His<sub>6</sub> in den restlichen drei getesteten Lösungen sehr hoch und mit einem Unterschied von 5 % nicht signifikant voneinander zu unterscheiden (Balken 5, 8 und 11).

Mit einer Reduktion der Löslichkeit um 10 % zeigte Sec62N-His<sub>6</sub> in der Stammlösung mit hoher Salzkonzentration und ohne Detergens nach zwei Einfrieren-Auftauen-Zyklen die größte Sensibilität diesem Vorgang gegenüber (Balken 9).

Die Zugabe von Detergens erhöhte die Löslichkeit des Proteins bei Niedrigsalz-Bedingungen (Balken 5 gegenüber 2) und machte das Protein gegenüber dem Einfrieren-Wiederauftauen leicht stabiler als bei Hochsalz-Bedingungen (Balken 8-9 verglichen mit 11-12).

Es ist bei dieser Analyse zu bemerken, dass die beste Reinigung von Sec62N-His<sub>6</sub> unter Hochsalzbedingungen erreicht wurde (Spuren 7-12 Abb. 10). Aus diesem Grund und wegen der etwas niedrigeren Sensibilität auf das Enfrieren-Wiederauftauen wurde für die Untersuchungen der Bindung an Ribosomen Sec62N-His<sub>6</sub> eingesetzt, das unter Hochsalz- und Detergens-Bedingungen isoliert und gehalten wurde. Die Stammlösungen wurden höchstens drei Mal verwendet.





Von vier unterschiedlichen Sec62N-His<sub>6</sub>-Stammlösungen (50 mM KCI bzw. 500 mM KCI und/oder 0,65 % CHAPS) (II.4.4 und Abb. 10) wurden jeweils 5 µl entnommen und für einer SDS-PAGE (siehe II.3.2) weiter verarbeitet (Auftrag). Dann wurden jeweils 50 µl der Stammlösungen zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und davon jeweils 5 µl für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet. (ÜS). Der restliche Überstand wurde zweimal hintereinander bei -80°C schockgefroren und dann wiederaufgetaut. Es wurde wieder zentrifugiert und von dem Überstand jeweils 5 µl entnommen und für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet (ÜS\*\*). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung analysiert (siehe II.3.4). **A)** Mit Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel nach Elektrophorese der Proben. **B)** Quantifizierung der Proteinmenge als Prozent des gesamt aufgetragenen Proteins (Auftrag).

#### II.4.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen in präparativem Maßstab

Die Isolierung des im RTS 500-System synthetisierten GST-Sec62C folgte dem oben beschriebenen Prinzip der Affinitätschromatographie, geschah jedoch in 20 ml-Säulen mit Bettvolumina ("disposable chromatography columns") an GSH-Sepharose. Die Glutathion-S-Transferase (GST), mit dem die C-terminal cytosolische Domäne von Sec62p markiert ist, wird für die Reinigung verwendet. Sie ist ein cytoplasmatisches Enzym aus *Schistosoma japonicum* mit einem Molekular-gewicht von 26 kDa, das hochspezifisch an den GSH-Anteil der verwendeten Sepharose bindet. Die Aufreinigung erfolgte im Prinzip wie für die Reinigung des His<sub>6</sub>-Fusionsproteins beschrieben.

Dafür wurden 1,5 ml Glutathion-Sepharose 4B-Suspension in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt, für 10 min bei 4°C und 1.000 Upm in einer GS-6KR-Zentrifuge zentrifugiert, den Überstand abgenommen und mit 13 ml PBS/KM Puffer gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet wieder gewaschen, zentrifugiert und auf 10 ml mit PBS/KM Puffer aufgefüllt.

Nach der Synthese im RTS 500-System wird die Reaktionslösung für 10 min bei 14.000 Upm in einer Kühlzentrifuge bei 2°C zentrifugiert. Der Überstand wird in das 15 ml Plastikröhrchen überführt, in dem sich die zuvor vorbereitete GSH-Sepharose befand. Dieses wurde bei 4°C unter Rollen für mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in die unten geschlossene Chromatographie-Säule überführt, mit einer Fritte oben verschlossen, unten geöffnet und zwei Mal mit 1 Bettvolumen PBS/KMT gewaschen. Die darauf folgende Elution des Proteins erfolgte in der Regel mit 8 ml GSH-Elutionspuffer in 1 ml-Schritten. Die Fraktionen, die das eluierte Fusionsprotein enthielten, wurden mit Hilfe des "Bio-Rad Protein Assay" analysiert.

Nach der Elution der Proteine wurden die Fraktionen, die das eluierte Protein enthielten, über eine PD10-Säule in den für die späteren Versuche benötigten Puffer (cMv500-Puffer) gebracht (siehe II.4.6), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

70

PBS-Puffer (10x):	PBS/KM-Puffer:	PBS/KMT-Puffer:
1,5 M NaCl	1x PBS (10x)	1x PBS (10x)
50 mM NaH₂PO₄ · H₂O	3 mM KCl	3 mM KCl
200 mM Na₂HPO₄ · H₂O	1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>
in bidest. H <sub>2</sub> O	in bidest. H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) Tween20
pH auf 7,3 eingestellt sterilfiltriert	sterilfiltriert	in bidest.H <sub>2</sub> O sterilfiltriert

<u>GSH-Elutionspuffer:</u> 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM Glutathion (reduzierte Form) in bidest. H<sub>2</sub>O frisch angesetzt

30



#### II.4.6 Methoden zur Entsalzung und Umpufferung

Nach Affinitätschromatographie wurden die Eluate, zum Entsalzen, oder um sie in einem für die späteren Versuche geeigneten Puffer zu bringen, gelfiltriert. Dafür wurden PD10-Gelfiltrationssäulen, die als Säulenmaterial 5 ml Sephadex G-25 enthalten, verwendet. Die Protein-Probe darf ein Volumen von 2,5 ml nicht überschreiten. Alle Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Puffern durchgeführt. Die Säule wurde zunächst mit mindestens 25 ml des Puffers äquilibriert, in den das Protein umgepuffert werden sollte. Dann wurden 2,5 ml der Proteinlösung in 1 ml-Schritten aufgetragen, wobei wenn mehrere Fraktionen unterschiedlicher Konzentration umzupuffern waren, die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration zuerst aufgetragen wurde. Im Anschluss an den Probenauftrag wurde weiter Puffer in 1 ml-Fraktionen auf die Säule aufgetragen. Gleichzeitig zum Auftragen des ersten Probenauftrags wurden mindestens 8 Fraktionen von jeweils 1 ml in Eppendorfreaktiosgefäßen gesammelt. Die Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde mittels der OD<sub>280</sub> (siehe II.3.9) bestimmt. Die Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden dann vereinigt. Sollte die Konzentration des "Pools" zu niedrig sein, so wurde er aufkonzentriert (siehe II.3.12). Die genaue Konzentration des Konzentrats wurde dann densitometrisch bestimmt (siehe II.3.9). Das Konzentrat wurde dann aliquotiert, in flüssigem Stickstoff zunächst schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### II.5 Präparationen aus Hundepankreas

## II.5.1 Isolierung von luminalen Proteinen (RP= Retikuloplasma) aus Hundepankreasmikrosomen

Um Transportvorgänge in dem endoplasmatischen Retikulum zu untersuchen wurden Proteoliposomen verwendet (siehe II.5.2). Als positive Kontrolle, um die Funktionalität der verwendete Proteoliposomen zu testen, wurden bei diesenVersuche mit luminalen Proteinen gefüllten Proteoliposomen eingesetzt. Sie enthielten alle Komponenten, die für den Transport von Proteinen in deren Lumen notwendig waren.

Mit der folgenden Methode konnte eine Gesamtfraktion an luminalen Proteinen aus Hundepankreasmikrosomen isoliert werden, die für die spätere Zusammensetzung der Proteoliposomen nötig war.

Alle Arbeitsschritte zur Isolierung der luminalen Proteine von Hundepankreasmikrosomen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 2-4°C durchgeführt. 15 ml einer Hundepankreasmikrosomen-Suspension wurden in 26,5 ml-Ti-70-Röhrchen für 45 min bei 45.000 Upm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend in 10 ml Retikuloplasmapuffer resuspendiert und in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt. Auf das resultierende Volumen von ca. 11 ml wurde 10 %ige CHAPS-Lösung zugegeben, so dass die Endkonzentration 0,65 % (w/v) betrug. Die Solubilisierung der Mikrosomen erfolgte für 30 min in einem Überkopf-Schüttler. Es schloss sich eine Zentrifugation für 60 min bei 100.000 Upm im TLA-100.3 Rotor an. Zum Entfernen des Detergens wurden die Zentrifugationsüberstände mit 5 g Bio-Beads (in Retikuloplasmapuffer äquilibriert) vermischt (50 ml Plastikröhrchen) und für 3 h rollend inkubiert. (Zur Äquilibrierung der Bio-Beads wurden diese zunächst 3x mit Methanol (p.a.), dann 3x mit dest. Wasser gewaschen und anschließend im Retikuloplasma Puffer äquilibriert). Nach dem Abtrennen der Bio-Beads durch eine Zentrifugation für 5 min bei 1.000 Upm wurde der Überstand erneut einer Ultrazentrifugation für 60 min bei 100.000 Upm (TLA-100.3 Rotor) unterzogen. Der Überstand enthielt jetzt eine Gesamtfraktion von luminalen Proteinen aus Hundepankreasmikrosomen, die weitgehend von den Membranproteinen sowie Lipiden der Mikrosomen getrennt war. Diese Protein-Lösung (12-13 ml) wurde mit Centricon YM-30-Konzentratoren durch ca. 2-3 h Zentrifugation bei 5.000 Upm im JA-20 Rotor auf ein Volumen von 120 µl (ca. 150 mg/ml) konzentriert und mit KCI (zur 400 mM Endkonzentration) und Sacharose (zur 200 mM Endkonzentration) versetzt. Die isolierten luminalen Proteine konnten jetzt aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

#### Retikuloplasmapuffer:

20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 bei 4°C 50 mM KCI 1,5 mM MgCI<sub>2</sub> 1 mM EDTA/KOH, pH 7,5 bei 4°C 2 mM DTT

Die Auftrennung der Proteinlösung im Gegensatz zu einem Retikuloplasma-Standard in SDS-Gelen mit anschließender Coomassie-Färbung ergab dasselbe Protein-Banden-Muster. Der Western Blot-Analyse der Lösung nach SDS-PAGE zeigte, dass typische luminale Proteine wie Grp170, Grp 94, BiP, PDIp, PDI und Calretikulin sehr stark angereichert vorlagen, während typische Membranproteine wie Sec61αp, Sec62p und Sec63p nur in sehr geringen Mengen enthalten waren (Tyedmers, 2001). Anschließend wurde die Funktionalität des gewonnenen Retikuloplasmas nach Rekonstitution mit Membranproteinen in einem Transportversuch mit Proteoliposomen gegenüber Mikrosomen getestet. Dafür wurden "leere" Proteoliposomen und Proteoliposomen mit Retikuloplasma (RP) hergestellt (siehe II.5.2). Sie wurden jeweils zu einem *in vitro*-Translationsansatz zugegeben, in dem der cotranslationale Transport von ppL erfolgte. Anschließend wurde jeweils ein Sequestrierungstest durchgeführt und die Reaktion durch Phosphorimaging analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 14 dargestellt.



#### Abb. 14 : Test der Funktionalität des Retikuloplasmas (RP)

Es wurden leere Proteoliposomen (PL Ø) und Proteoliposomen mit zwei verschiedenen Mengen Retikuloplasma (PL+RPa (2,5 μl RP im Ansatz) bzw. PL+RPb (5 μl RP im Ansatz) (siehe II.5.2)). Ein Translationsansatz mit Retikulozytenlysat Typ II wurde angesetzt (siehe II.7.1). Den Vesikeln (Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1) und Proteoliposomen) bzw. Puffer wurde jeweils ein Aliquot des Translationsansatzes zugegeben. Diese Ansätze wurden nun für 60 min bei 30°C inkubiert und anschließend einem Sequestrierungstest unterzogen (siehe II.7.2). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe II.3.2) und mittels Phosphorimaging (siehe II.3.7) analysiert. **A)** Bild nach Phosphorimaginganalyse der Proben. In der Abbildung links, unter "Kontrolle", sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliquots. In der Mitte der Abbildung, unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots. **B)** Auswertung der Transporteffizienz in den jeweiligen Vesikeln. Die linke Abbildung zeigt die Transporteffizienz der in Mikrosomen (RM) transportierten [<sup>35</sup>S]-ppL. Die rechte Abbildung zeigt die Transporteffizienz der in die verschiedene Proteoliposomen transportierten [<sup>35</sup>S]-ppL.

Die Transporteffizienz der Mikrosomen betrug etwa 90 %, das heißt, dass 90 % der prozessierten ppL-Ketten sich im Lumen der Mikrosomen, vor der proteolytischen Aktivität der Proteinase K geschützt, befanden. Dieses dient als Positivkontrolle der Reaktion und zeigt in diesem Fall, dass die Transportreaktion unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde.

Die Transporteffizienz der leeren Proteoliposomen betrug 35 %, im Gegensatz zu ca. 80 % Transporteffizienz der Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP), d.h., dass diese ungefähr doppelt so viel pL-Ketten effektiv transportiert haben. Da die zusätzlichen luminale Proteine der einzige Unterschied zwischen den leeren und den mit Retikuloplasma gefüllten Proteoliposomen darstellen, ist die Transporteffizienzerhöhung auf diese zurückzuführen. Das isolierte Retikuloplasma ist daher Funktional.

#### II.5.2 Herstellung von Proteoliposomen (PL)

Für die Herstellung von Proteoliposomen (PL) wurden PKRM verwendet. Diese werden durch Behandlung von rauen Hundepankreasmikrosomen (<u>RM</u>) mit 1 mM <u>P</u>uromycin und 0,5 M <u>K</u>CI erhalten. Durch diese Behandlung, nach der Methode von Görlich und Rapoport (Görlich und Rapoport, 1993) durchgeführt, werden die Ribosomen, die mit Membranproteinen an der Oberfläche der Vesikeln assoziiert sind, abgewaschen. Die Membranvesikel in den verwendeten PKRM-Suspensionen nehmen dabei etwa 1-2 % des Volumens der Suspension ein.

Als Proteoliposomen werden dann Vesikel bezeichnet, die dieselbe Membranprotein-Zusammensetzung haben wie die PKRM aus denen sie hergestellt werden und deren Inhalt nach Belieben variiert werden kann. Das Prinzip der Herstellung von Proteoliposomen ist in Abb. 15 dargestellt. Dafür werden in einem ersten Schritt die PKRM durch die Zugabe von Detergens solubilisiert. Die luminalen frei löslichen Proteine des ER, die sich in den Inneren der PKRM hoch konzentriert befinden, werden durch die Solubilisierung in dem Puffer freigesetzt. Da das Volumen der Vesikel zuvor nur einen sehr geringen Anteil der Suspension ausmachte, kommt es durch die Solubilisierung zu einer sehr starken Verdünnung dieser Proteine. Nach Dialyse wird das Detergens aus der Lösung entfernt und die solubilisierten Membranbestandteile können nun spontan wieder Vesikel bilden. Aufgrund ihres hydrophoben Charakters werden Membranproteine in die Lipid-

75

membran eingelagert. Daher der Name "Proteo-Liposomen". Bei der Bildung dieser Vesikel wird der Puffer, in dem sich die Membranen befinden und der die hoch verdünnten luminalen Proteine der PKRM enthält, als Lumen eingeschlossen. Somit enthalten solche, auch in der Literatur beschriebenen, "klassisch" hergestellten Proteoliposomen typische Membranproteine des ER, jedoch einen sehr geringen Gehalt an löslichen Proteinen (Görlich und Rapoport, 1993; Dierks *et al.*, 1996; Tyedmers *et al.*, 1996) Wurde Retikuloplasma (RP) (siehe II.5.1) bzw. Avidin in den Detergensextrakt in hoher Konzentration zugesetzt (im rechten Teil des Abb. 15 dargestellt), so werden diese Proteine im Inneren der Proteoliposomen eingeschlossen. (siehe Abb. 15) (Nicchitta und Blobel, 1993)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Proteoliposomen-Sorten hergestellt, die sich nur in ihrem luminalen Zusammensetzung unterschieden: 1) Proteoliposomen, die in Abwesenheit von Retikuloplasma hergestellt wurden, sogenannte "leere Proteoliposomen" (PLØ), 2) Proteoliposomen, die in Anwesenheit von Retikuloplasma (siehe II.5.1) hergestellt wurden, sogenannte "Proteoliposomen mit Retikuloplasma" (PL+RP), und 3) Proteoliposomen, die in Anwesenheit von Avidin hergestellt wurden, so genannte "Proteoliposomen mit Avidin" (PL+Av).

Als erstes wurde, für jede PL Sorte, folgender Ansatz in Beckman Zentrifugenröhrchen auf Eis vorgelegt:

33 μl PKRM-Suspension in Detergenspuffer
17 μl Detergenspuffer mit 35 % Glycerin
(50-A) μl Detergenspuffer ohne Glycerin
3 μl 200 mM ATP
7,1 μl 10 % CHAPS

Die Proben wurden dann für 30 min unter Schütteln bei 0-4°C inkubiert, wobei die Solubilisierung der PKRM erfolgte. Anschließend wurden zu jeder Probe die Proteine bzw. Puffer, die später den Inhalt der Proteoliposomen bilden sollten, zugegeben:

- 1) A µl Detergenspuffer ohne Glycerin
- 1,5-5 μl RP (entspricht eine Endkonzentration an luminalen Proteinen von 2,0-6,7 mg/ml, dies entspricht ca. 0,17-0,57 mg/ml BiP (Tyedmers *et al.*, 2003).

ad. A µl Detergenspuffer ohne Glycerin

3) 7-15 µl (= A) 160 mg/ml Avidin (in Detergenspuffer ohne Glycerin gelöst).

ad. A Detergenspuffer ohne Glycerin.

In dem Fall, dass Proteoliposomen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Avidin hergestellt wurden, wurden als A die µl bezeichnet, die die größte Volumen darstellten (z.B. drei Ansätze für Proteoliposomen plus 7 µl, 11 µl und 15 µl Avidin  $\rightarrow$  A = 15 µl)

Die Proben wurden dann kurz gevortext und zunächst für 25 min bei 68.000 Upm im TLA-100.3 Rotor bei 2°C ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und in neue Beckman Zentrifugenröhrchen, bei den der Deckel zuvor abgeschnitten wurde, überführt. Es wurde je 1,5 µl Phospholipid-Suspension (20 mg/ml (w/v) Phospholipid aus Ei in bidest. Wasser) zugegeben. Diese Ansätze wurden kurz auf dem Vortexer gemischt und für die Dialyse vorbereitet: Dafür wurden die im Dialysepuffer äquilibrierten Dialyseschläuche (sie wurden zuerst 3x 10 min mit einer Lösung aus 5 mM EDTA und 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, dann 1x 10 min mit dest. Wasser gewaschen und anschließend im Dialysepuffer äquilibriert) aufgeschnitten, flach auf die Öffnung der Zentrifugenröhrchen gelegt und mit einem passenden Gummiring fixiert. Die so vorbereiteten Zentrifugenröhrchen wurden dann umgedreht, um die Dialysemembran zu benetzen. Dann wurden sie über Kopf in ein Kunststoffrad mit Bohrlöcher für die Reaktionsgefäße eingesetzt. Das Kunststoffrad war an einem Metallstab geschraubt, der in einen Rührmotor eingespannt werden konnte. Das Kunststoffrad wurde nun schräg in ein Becherglas mit Dialysepuffer getaucht und mit 40 Upm gedreht. Dadurch wurde eine gleichmäßige Entfernung des Detergens ermöglicht. Die Dialyse erfolgte bei 2°C für 3 h und anschließend für 12 h gegen jeweils 1 l Dialysepuffer. Für den zweiten Dialyseschritt wurden dem Dialysepuffer 5,5 g in Dialysepuffer äquilibrierte SM2-Bio-Beads zugegeben, um eine möglichst vollständige Entfernung des Detergens zu gewährleisten. (Zur Äquilibrierung der Bio-Beads wurden diese erst 3x im Methanol (p.A), dann 3x im Dest. Wasser gewaschen und anschließend im Dialysepuffer äquilibriert. Nach Beendigung der Dialyse wurden die Lösungen, in den sich Proteoliposomen gebildet hatten, in neue Beckman Zentrifugenröhrchen überführt und 300 µl Verdünnungspuffer dazugegeben. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 68.000 Upm und 2°C im TLA-100.3 Rotor wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit 10 µl Proteoliposomenpuffer resuspendiert.



Abb. 15 : Schematische Darstellung der Herstellung von 1) leeren Proteoliposomen, 2) Proteoliposomen mit eingeschlossene luminale Proteine des ER und 3) Proteoliposomen mit eingeschlossenes Avidin

**PKRM** = "Puromycin/KCl"-behandelte Hundepankreasmikrosomen, **PL** = Proteoliposomen, **PLØ** = leere PL, **RP** = Retikuloplasma (siehe II.5.1), **Av** = Avidin. Erläuterungen siehe Text.

Die so hergestellten Proteoliposomen wurden dann direkt in einem *in vitro*-Translationsversuch mit anschließendem Sequestrierungstest verwendet.

Um zu bestätigen, dass der Gehalt an Membranproteinen für die verschiedenen Proteoliposomen vergleichbar war, wurde mit 1-3  $\mu$ l der Proteoliposomen eine SDS-PAGE durchgeführt und per Western Blot (siehe II.3.5) der Gehalt an Sec61 $\alpha$ analysiert. Detergenspuffer: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 bei 4°C 400 mM KCI 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT 1 mM EDTA 200 mM Saccharose (35 % (w/v) Glycerin) Dialysepuffer: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 bei 4°C 400 mM KCI 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM DTT 1 mM EDTA 250 mM Saccharose

Proteoliposomenpuffer: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 bei 4°C 50 mM KCl 2 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT 200 mM Saccharose

Verdünnungspuffer: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 bei 4°C 400 mM KCI 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM DTT 1 mM EDTA

## II.6 In vitro-Synthese präsekretorischer Proteine

#### II.6.1 In vitro-Transkription von mRNA mit SP6 RNA-Polymerase

Zur Transkription mit SP6 RNA-Polymerase wurden Plasmide eingesetzt, die kodierende Sequenzen für Proteine enthielten, welche einem SP6-Promotor nachgeschaltet waren (Krieg und Melton, 1984). Vor der Transkription wurden die Plasmide mit Restriktionsendonukleasen linearisiert (siehe II.2.3.1), die "stromabwärts" der kodierenden Sequenz spalteten. Die Linearisierung erhöhte die Ausbeute an Translationsprodukt nach *in vitro*-Transkription und anschließender *in vitro*-Translation. Die verwendeten Plasmide (pB4, pMB9, pLUC6) sind in der Tabelle 1 unter II.1.5 dargestellt. Das Plasmid pB4, welches die kodierende Sequenz für Präprolaktin (ppL) enthält, wurde mit *Eco*RI linearisiert, um die mRNA für ppL herzustellen. Die Linearisierung von pB4 mit *Pvu*II galt zur Herstellung einer mRNA, die kein Stop-Codon besaß und die für die Synthese von ppL86mer kodierte, was ein C-terminal verkürztes, 86 Aminosäuren langes Fragment von ppL darstellt. Im Folgenden ist das Pipettierschema eines *in vitro*-Transkriptionsansatzes dargestellt, die DNA wurde in einer Konzentration von etwa 40 µg/ml eingesetzt:

Transkriptionsansatz: 30 μl Prämix A 2 μg Plasmid-DNA 2,5 μl m<sup>7</sup>GpppG-Lösung 1,5 μl RNasin (40 U/μl) 1 μl SP6 RNA-Polymerase (20 U/μl) ad. 50 μl bidest. H<sub>2</sub>O

Prämix A-Lösung: 8,3 mM DTT 167 mg/ml BSA 0,17 mM GTP je 0,83 mM ATP, CTP, UTP in 40 mM HEPES/KOH pH 7,4, 6 mM MgAc, 2 mM Spermidin

<u>m<sup>7</sup>GpppG-Lösung:</u> 5 U m<sup>7</sup>GpppG in 300 μl 10 mM HEPES/KOH, pH 7,9

Nach Inkubation für 3 h bei 40°C im Wasserbad wurde die Polymerasereaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Das Transkript wurde entweder direkt zur *in vitro*-Translation eingesetzt (siehe II.6.2) oder bei -80°C aufbewahrt.

#### II.6.2 In vitro-Synthese präsekretorischer Proteine

Die *in vitro*-Synthese von Proteinen in Retikulozytenlysaten wurde in zwei verschiedenen Systemen durchgeführt:

1. Translation Kit, Retikulozytenlysat, Typ II (Roche Diagnostics).

2. Biotin in vitro-Translation Kit (Roche Diagnostics)

Den beiden Systemen liegt Kaninchen-Retikulozytenlysat zugrunde. In beiden Systemen konnte durch die Verwendung von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin eine radioaktive Markierung der synthetisierten Proteine erreicht werden.

# II.6.2.1 In vitro Synthese im Roche-Diagnostics-System mit radioaktiver Markierung

Zur *in vitro*-Translation wurde Kaninchen-Retikulozytenlysat eingesetzt, in dem alle zur Translation erforderlichen Proteine und Co-Faktoren anwesend waren. Die

Konzentration aktiver Ribosomen im Retikulozytenlysat beträgt etwa 0,75 µM. Bei den Retikulozyten handelt es sich um zellkernfreie Vorläuferformen der Erythrozyten, so dass keine endogene DNA im Lysat vorhanden sein konnte. Endogene noch enthaltene mRNA wird durch eine Behandlung mit RNase abgebaut. Somit ermöglicht das System die gezielte Synthese bestimmter Proteine durch Zugabe der entsprechenden mRNA.

Die Translationsansätze für eine *in vitro*-Translation wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Translationsansatz		für Untersuchungen der Translationshemmung ei- nes Rekombinantproteins Versuche		
Kaninchen-Retikulozytenlysat, Typ II (Translationskit)		20 % 40 %		
MgAc <sub>2</sub> (25 mM) (Translationskit)		6 %		
KAc (2,5 M) (Translationski	t)	4 %		
Translationsgemisch ohne Methionin (Translationskit)		8 %		
[ <sup>35</sup> S]-Methior	[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000 Ci/mmol) 8 %		%	
Transkript pB4 (linearisiert mit <i>Eco</i> RI bzw. /		II) 6 %		
von den	oder	oder		
Plasmiden:	pLUC6 bzw. pMB9	15 %		
autoklaviertes bidest. H <sub>2</sub> O		ad. 100 %		

 Tabelle 9 : Pipettierschema eines Ansatzes zur in vitro-Translation

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert, die Reaktion bei 30°C für 15-60 min inkubiert. Für eine Analyse der Synthese wurden die Proben in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe II.3.2). Die Auswertung erfolgte durch Phosphorimaging (siehe II.3.7).

## II.6.2.2 In vitro Synthese im Roche-Diagnostics-System mit Biotin-Markierung

Die Grundlage dieser *in vitro*-Synthese war ebenfalls das Retikulozytenlysat. Die Markierung erfolgte jedoch über mit Biotin beladene Lysinreste, die während der Synthese in das naszierende Peptid eingebaut wurden. Diese Lysinreste befanden sich im Translationsgemisch in Form von Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup>.

Für eine *in vitro*-Translation mit Biotin-Markierung wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert und anschließend für 15 min bei 30°C inkubiert:

Tabelle 10 : Pipettierschema eines Ansatzes zur in vitro-Translation

Translationsansatz	
Kaninchen-Retikulozytenlysat (enthält 0,33 µM Biotin-Lysin-tRNA <sup>Lys</sup> ) (Biotin- <i>invitro</i> -Translationskit)	60 %
Transkript von den Plasmid pB4 (linearisiert mit EcoRI bzw. Pvull)	8 %
autoklaviertes bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100 %

Für eine Analyse der Synthese wurden die Proben in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe II.3.2). Die Auswertung erfolgte durch Phosphorimaging (siehe II.3.7).

#### II.6.3 Analyse der Art der Hemmung auf die in vitro-Translation

Bei den Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Sec62p, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, ob das getestete Protein eine Hemmung der *in vitro*-Synthese von Proteinen durch die Inhibition der Initiation oder der Elongation bei der Translation hervorruft. Um dies zu analysieren, wurde der Effekt des Proteins auf die *in vitro*-Translation von Präprolaktin mit dem von einem Inhibitor der Initiation, ATA (Aurintricarboxylsäure), und einem Inhibitor der Elongation, CHI (Cycloheximid), verglichen. Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde angesetzt (siehe II.6.2.1). Er wurde aliquotiert und die Aliquots für 6 min bei 30°C vorinkubiert. Während dieser Zeit wurde die Translation der mRNA initialisiert und somit die Synthese von ppL gestartet. Anschließend wurden den Aliquots Puffer (bidest. H<sub>2</sub>O + cMVP500 + 20 mM HEPES) bzw. verschiedene Kombinationen der Inhibitoren (ATA bzw. CHI) mit dem zu testenden Protein (Sec62N-His<sub>6</sub> in cMVP500-Puffer) zugegeben. Die Konzentration der Inhibitoren im Translationsansatz war für ATA 30 µg/ml und für CHI 100 µg/ml. Die Translationsansätze wurden nun weiter bei 30°C inkubiert, wobei nach 4, 8 und 16 Minuten Proben entnommen und für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden (siehe II.3.2). Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt (siehe II.3.7).

ATA-Stammlösung (10x): 15,84 mg/ml in 100 mM KOH

ATA-Lösung (1x): 10 % ATA-Stammlösung (10x) in 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5

<u>CHI-Lösung:</u> 2,5 mg/ml in bidest. H<sub>2</sub>O <u>cMV500-Puffer:</u> 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 500 mM KCI 200 mM Saccharose 2 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM DTT 0,65 % (w/v) CHAPS in bidest. H<sub>2</sub>O sterilfiltriert

# II.7 Transport von Vorstufenproteinen in Hundepankreasmikrosomen oder Proteoliposomen

Diese Experimente stellten ein zellfreies System zum Untersuchung des Transportes von Vorläuferproteinen in das endoplasmatischen Retikulum von Säugern dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der cotranslationalen Transport (siehe I.3.2) verschiedener Proteine (ppL, ppL86mer, Luc und pLuc (siehe Tabelle 3 unter II.1.8) untersucht. Dabei wurden diese Proteine radioaktiv ([<sup>35</sup>S]-Methionin) und/oder mit Biotin-Lysin markiert. Der cotranslationale Transport erfolgte in Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1) oder in verschiedenen Proteoliposomen (siehe II.5.2).

## II.7.1 Cotranslationaler Transport von *in vitro*-synthetisierten Proteinen in Hundepankreasmikrosomen oder Proteoliposomen

Um einen cotranslationalen Transport von präsekretorischen Proteinen in Mikrosomen oder Proteoliposomen zu erhalten, wurde vor Synthesebeginn dem *in vitro*-Translationsansatz (siehe II.6.2.1 und II.6.2.2) eine Suspension mit Hundepankreasmikrosomen bzw. Proteoliposomen zugesetzt. Die Konzentration, mit der die Hundepankreasmikrosomen- und Proteoliposomen-Suspension eingesetzt wurde, betrug 2,5-10 % vom Translationsansatz. (Sollten Proteoliposomen verwendet werden, so wurden alle für den Versuch verwendeten Vesikel zuvor mit Biotinlösung für 30-60 min vorinkubiert, wobei die Biotin-Endkonzentration 6 mM betrug). Während der anschließenden Inkubation bei 30°C für 15-60 min erfolgte die Synthese der entsprechenden Proteine, die gleichzeitig in das Lumen der Vesikel transportiert werden konnten. Im Fall der Synthese von Präprolaktin86mer (ppL86mer) wurde nach der Synthese Puromycin-Lösung (Endkonzentration 1,25 mM) dazugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei 30°C inkubiert. So wurde die pL56-Kette vom Ribosom freigesetzt, was die Beendigung des Transports möglich machte. Nach der Synthese wurde der Ansatz entweder einem Sequestrierungstest (siehe II.7.2) mit anschließender SDS-PAGE oder direkt einer SDS-PAGE (siehe II.3.2) unterzogen.

Die verwendeten Proteoliposomen wurden direkt nach ihrer Herstellung für die Versuche eingesetzt, ohne sie einzufrieren.

<u>Biotinlösung:</u>	MV-Puffer (Mikrosomen Verdünnungspuffer):
12 mM Biotin	20 mM HEPES/KOH, pH 7,0
in MV-Puffer	50 mM KCl
	200 mM Saccharose
Puromycin-Lösung:	2 mM MgCl <sub>2</sub>
12,5 mM Puromycin	2 mM DTT
in bidest. H <sub>2</sub> O	in bidest. H <sub>2</sub> O
	sterilfiltriert

#### II.7.2 Test auf Sequestrierung

Der Sequestrierungstest diente der Untersuchung des Transports eines prozessierten Präproteins (ppL bzw. ppL86mer) in das Lumen von Mikrosomen oder Proteoliposomen. Hierfür wurde ein Standard-Transportansatz nach dessen Inkubation auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen, und in drei Aliquots von je 3,5 µl (ppL Synthese in Retikulozytenlysat Typ II) bzw. 15 µl (ppL bzw. ppL86mer Synthese in Biotin in vitro Translation Kit) aufgeteilt. Die Aliquots wurden an die Wand von drei Eppendorfreaktionsgefäßen pipettiert, die zuvor vorbereitet waren. Für die Vorbereitung wurden pro Translatinsansatz drei Eppendorfreaktionsgefäße bereit auf Eis gestellt, bei dem die gleichen Volumina, wie sie später Translationsansatz zupipettiert wurden, vorgelegt wurden: Im ersten Saccharose-Lösung (Kontrolle), im zweiten Proteinase K-Lösung, im dritten Proteinase K/TritonX-100-Lösung. Nach dem die Translationsansatz-Aliquots in jedem Eppendorfgefäβ (an die Wand) zupipettiert wurden, folgte eine Zentrifugation (10 s bei 14.000 Upm in einer Tischzentrifuge) mit anschließendem Vortexen. Die Reaktion erfolgte für 60 min bei 0°C. Um die Reaktion zu stoppen wurde 20 % (v/v) 100 mM PMSF (in Ethanol gelöst) zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.3.2) und die Reaktion mittels Phosphorimaging analysiert (siehe II.3.7).

Saccharose-Lösung: 162,5 mM Saccharose in bidest. H<sub>2</sub>O

Proteinase K-Lösung: 162,5 mM Saccharose 340 µg/ml Proteinase K in bidest. H<sub>2</sub>O Proteinase K/TritonX-100-Lösung: 162,5 mM Saccharose 340 μg/ml Proteinase K 0,2 % (w/v) TritonX-100 in bidest. H<sub>2</sub>O

# II.8 Ribosomenbindungsversuche: Bindung verschiedener Rekombinatproteine an Ribosomen

#### - Bindung eines Rekombinatproteins an Ribosomen

In Rahmen der Studie von Sec62p wurden verschiedene Rekombinatproteine (Sec62N-His<sub>6</sub>, Sec62N∆N10, Sec62N98-180, und GST-Sec62C (siehe Tabelle 3)), auf eine mögliche Bindung an Ribosomen untersucht. Hierfür werden cytosolische Ribosomen verwendet, die aus einer Hundepankreasmikrosomenpräparation gewonnen wurden (siehe II.1.9.1). Die zu untersuchenden Proteine wurden wie folgt eingesetzt:

	Protein-Kontrolle	Ribosomen-Kontrolle	Bindungsansatz	
Protein-Lösung (in cMV500-Puffer)	0,14-2,8 µM	-	0,14-2,8 μM	
Ribosomen	-	3,5 µl	2,5-3,5 µl	
cMV500-Puffer	die Endkonzentration von KCI wurde auf 100-150 eingestellt			
Puffer-100 ad. 610 µl		ad. 610 µl	ad. 610 µl	

Tabelle 11 : Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs

Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert, dann für 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend je auf ein Saccharose-Kissen (327 µl), das in einem Polycarbonatzentrifugenröhrchen zuvor vorgelegt war, aufgetragen. Das Kissen diente der besseren Abtrennung der Ribosomen und möglicher assozierter Proteine vom Rest der in der Lösung verbleibenden Proteine. Nach einer Zentrifugation im TLA 120 Rotor für 90 min, bei 2°C und 100.000 Upm wurden die Überstände möglichst schnell abgenommen und in je ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefä $\beta$  überführt, wo eine TCA-Fällung folgte (siehe II.3.1). Die Pellets wurden in 26 µl Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefä $\beta$ e überführt. Es wurde mit allen Proben (Pellets und gefällte Überstände) eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe II.3.2). Das Gel wurde anschließend per Coomassie-Färbung analysiert (siehe II.3.4).

Puffer-100:	<u>cMV500-Puffer:</u>	Saccharose-Kissen:
20 mM HEPES/KOH, pH 7,5	20 mM HEPES/KOH, pH 7,5	40 mM HEPES/KOH, pH 7,5
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM MgCl <sub>2</sub>	150 mM KAc
1 mM EDTA/KOH, pH 7,5	200 mM Saccharose	5 mM MgAc <sub>2</sub>
0,65 % (w/v) CHAPS	0,65 % (w/v) CHAPS	500 mM Saccharose
100 mM KCI	500 mM KCl	2 mM DTT
in bidest. H₂O	2 mM DTT	in bidest. H <sub>2</sub> O
sterilfiltriert	in bidest. H <sub>2</sub> O	sterilfiltriert
	sterilfiltriert	

#### -Kompetition für die Bindung an Ribosomen

Mit Hilfe der Ribosomenbindungsversuche konnte auch untersucht werden, ob zwei verschiedene Proteine miteinander um die Bindung an Ribosomen kompetieren konnten. Der Ansatz und Aufbau eines solchen Versuches erfolgte analog zu dem der Bindung an Ribosomen (siehe oben), nur dass in diesem Fall zwei verschiedene Proteine gleichzeitig zum Ansatz gegeben wurden.

# Verdrängung eines am Ribosom gebundenen Proteins durch ein anderes Protein

Bei diesen Versuchen wurde untersucht, ob die Bindung an Ribosomen eines zuvor gebundenen Proteins durch die spätere Zugabe eines zweiten Proteins reversibel war. Hierzu wurde ein Ansatz, analog zu dem Bindungsansatz (siehe oben), mit dem ersten Protein versetzt. Nach der 15 minütigen Inkubation wurde der Ansatz auf Eis gestellt und das zweite Protein dreifach konzentriert zum Ersten zugegeben. Nun wurde es wieder bei 30°C für 15 min inkubiert und anschließend auf ein Saccharose-Kissen geschichtet. Nach Zentrifugation (90 min bei 30°C und 100.000 Upm im 120.2 Rotor) wurden die Überstände möglichst schnell abgenommen und in je ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäβ überführt, wo eine TCA-Fällung folgte (siehe II.3.1). Die Pellets wurden in 26 µl Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäβe überführt. Es wurde mit allen Proben (Pellets und gefällte Überstände) eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe II.3.2). Die aufgetrennte Proteine wurden anschließend per Coomassie-Färbung analysiert (siehe II.3.4).

#### **II.9** Diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation

Im Rahmen der Untersuchungen an Sec62N-His<sub>6</sub> wurde auch die Methode der diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Diese Methode stellt ein System dar, in dem Makromoleküle ihrer Molekularmasse nach aufgetrennt werden können. Hierfür wird eine Suspension, mit den aufzutrennenden Makromolekülen, auf einen Saccharose-Gradienten geschichtet und anschließend zentrifugiert. Während der Zentrifugation sedimentieren die Makromoleküle im Gradienten. Dabei verbleiben kleinere Moleküle im oberen Teil des Gradienten, gröβere oder assoziierte Moleküle wandern tiefer in den Gradienten hinein.

Eine Lösung des zu untersuchenden Proteins wurde analog zu den Ribosomenbindungsversuchen (siehe II.8) mit und ohne Ribosomen eingesetzt. Dazu wurden noch 6 µl einer BSA-Lösung (10 mg/ml) zupipettiert:

Bindungansatz für Dichtegradienter	nzentrifugation:
Proteinlösung (in cMV500-Puffer)	0,28-1,0 μM
Ribosomen	+/- 2,5 bzw.5 μl
cMV500-Puffer	bis KCI-Endkonzentration 100-120 mM
BSA (10 mg/ml)	6 µl
Puffer-100	ad. 610 µl

Dieser Ansatz, der auf Eis pipettiert wurde, wurde für 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Während der Inkubation wurde der Gradient vorbereitet: dafür wurden 700 µl jeder Saccharose Lösung nacheinander (60 zu 10 %) vorsichtig in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach der Inkubation des

87

Bindungsansatzes wurde dieses vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation im "swing-out"-Rotor SW55TI für 1 h bei 54000 Upm bei 2°C (Modus: accel. slow, decel. slow). Zur Abnahme des Gradienten wurden die Zentrifugenröhrchen so angestochen, dass die Flüssigkeit abtropfen konnte. Es wurden pro Zentrifugenröhrchen 15-16 Fraktionen von ca. 300 µl gesammelt. Die Proteine in den Fraktionen wurden nach Wessel und Flügge gefällt (siehe II.3.1), durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe II.3.2) und mittels Coomassie Färbung analysiert (siehe II.3.4).

I ÖSUNGEN	SACCHAROSEKONZENTRATION (%)					
	60	50	40	30	20	10
2,5 M Saccharose (ml)	7	5,9	4,72	3,54	2,36	1,18
2 M KCI (µI)	500					
20 % (w/v) CHAPS (µI)	350					
1 M HEPES (µl)	200					
1 M MgCl <sub>2</sub> (μl)	50					
20 mg/ml BSA (µl)	16,6					
bidest. H <sub>2</sub> O (ad. 10 ml)	1,88	2,98	4,16	5,34	6,52	7,7

 Tabelle 12 :
 Pipettierschema zur Herstellung von Saccharose-Stufen in Puffer-100

### **III. ERGEBNISSE**

# III.1 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von BiP bei der cotranslationalen Translokation sekretorischer Proteine in das ER-Lumen

#### III.1.1 Angewendete Strategie

Das Säuger Hsp70-Chaperon BiP ist, durch die direkte Interaktion mit dem zu transportierenden Substrat, an späten Schritten der cotranslationalen Translokation beteiligt (siehe I.2.1.1). Ob diese Interaktion während der Translokation ("Ratchet Mechanismus") oder dieser anschließend ("Trapping Mechanismus") sollte untersucht werden (siehe 17). Um den cotranslationalen Transport in vitro zu rekonstituieren wurden unterschiedliche Proteoliposomen verwendet (siehe II.5.2), und eine Avidin-Biotin-Interaktion wurde als artifizielles System zur Nachahmung der BiP-Substrat-Interaktion analysiert. In den hergestellten Proteoliposomen, die Avidin enthalten, kann dieses nur das zu translozierende Protein binden und somit als artifizieller Bindungspartner arbeiten, wenn das Substratprotein mit Biotin markiert ist und wenn die biotinylierten Reste für das Avidin erreichbar sind. Um die zu translozierenden Proteine mit Biotin markieren zu können, wurde die entsprechende mRNA in einem Retikulozytenlysat eingesetzt, in dem die Aminosäure Lysin in Form von Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> vorlag. Diese biotinylierten Lysine wurden in die naszierende Kette eingebaut (siehe II.6.2.2 und Abb. 16). Um die Transportreaktion nachvollziehen zu können, wurden die zu transportierenden Ketten auch radioaktiv markiert. Dafür wurde zum Biotin-Translationsansatz [<sup>35</sup>S]-Methionin zugegeben, das in die naszierenden Ketten eingebaut wurde. In der Abb. 16 sind die Methionin- und Lysinreste in beiden verwendeten Susbstratproteinen dargestellt.

Als Substrat für den Transport wurden zwei Proteine verwendet, Präprolaktin (ppL) und Präprolaktin86mer (ppL86mer), die Modellproteine für die Untersuchung des cotranslationalen Transports in das ER sind (Connolly und Gilmore, 1986; Kurzchalia *et al.*, 1986; Jungnickel und Rapoport, 1995; Mothes *et al.*, 1998; Tyedmers *et al.*, 2003; Woolhead *et al.*, 2004). ppL86mer stellt eine C-terminal verkürzte Form von ppL dar, die aus 86 Aminosäureresten besteht (siehe Abb. 16). Die mRNA, die für die Synthese von ppL86mer

eingesetzt wurde, enthält in ihrer Sequenz kein Stop-Codon, so dass die Ribosomen das synthetisierte Protein nicht freisetzen können. Erst nach der Zugabe von Puromycin, einem Aminoacyl-tRNA-Analogon, wird die naszierende Kette freigesetzt. Bei dem cotranslationalen Transport von ppL86mer führt dies dazu, dass die zu transportierenden Peptidketten so lange im Translokon "stecken" bleiben, bis nach Zugabe von Puromycin die Ketten fertig transportiert werden können.



#### Abb. 16 : Darstellung der Substratproteine ppL und ppL86mer

Nach der Prozessierung der Signalsequenz (SS) von ppL entsteht das reife Protein Prolaktin (pL). Es besteht aus 199 Aminosäureresten. Nach der Prozessierung von ppL86mer entsteht das reife Protein pL56mer, aus 56 Aminosäureresten bestehend. Mit einem roten bzw. gelben Stern sind die Lysin- bzw. Methioninreste dargestellt. Die Position der Proben wurde geschätzt unter der Annahme, dass 35 Aminosärereste den ribosomalen Ausgangstunnel, 7 Aminosäurereste die Lücke zwischen Ribosom und Translokon und 15 Aminosäurereste das Translokon durchspannen.

#### III. Ergebnisse

Wird ppL in einem Transportversuch in Proteoliposomen mit Avidin eingesetzt, so wird die Effizienz des Transports im Vergleich zu Proteoliposomen die kein Avidin enthalten verbessert (Tyedmers, 2001; Tyedmers *et al.*, 2003). Die ppL-Kette hat eine Länge von 229 Aminosäuren, während des cotranslationalen Transports erreichen die biotinylierten Lysinreste das Lumen der Vesikel (siehe Abb. 17) und werden von Avidin gebunden, was den Transport der Substratproteine unterstützt. Dieses ist in Abb. 17 dargestellt. In diesem Fall könnten die pL-Ketten sowohl während ihrer Translokation durch den Kanal, als auch später, wenn sie fertig transloziert worden sind, von Avidin gebunden werden. Es kann daher nicht unterschieden werden, ob der Transport durch "ratchet" oder "trapping" der Ketten stimuliert wurde.



#### Abb. 17 : Darstellung des Verlaufs des cotranslationalen Transports von Biotin-ppL in Proteoliposomen mit Avidin

Während des cotranslationalen Transports erreichen die biotinylierten Lysinreste das Lumen der Proteoliposomen. Dort werden sie von Avidin gebunden, was sich in einem verbesserten Transport des reifen Proteins Prolaktin (pL) auswirkt. Die Avidinmoleküle können das reife pL sowohl während als auch nach seiner Translokation binden.

Wird hingegen ppL86mer im gleichen System eingesetzt, so kann Avidin nur binden, wenn die Interaktion nach dem "Trapping Mechanismus" erfolgt. Da die Kette von ppL86mer nur eine Länge von 86 Aminosäureresten hat und am Ribosom gebunden bleibt, verbleiben die biotinylierten Reste im Inneren des Translokons und damit außerhalb der Reichweite des Avidins (siehe Abb. 18). Nach der Zugabe von Puromycin wird die Kette freigesetzt und kann nun entweder in das Cytosol oder in das Lumen diffundieren. Wird, im Gegensatz zu Proteoliposomen die kein Avidin enthalten, eine Stimulierung des Transports beobachtet, kann dies nur zurükzuführen sein auf eine Bindung des Substratsproteins durch das Avidin, und dies erfolgt bei ppL86mer nur im Fall, dass die naszierende Ketten ohne Hilfe von zusätzlichen Faktoren in das Lumen gelangt sind. Die Ketten werden erst gebunden, nachdem sie fertig transportiert sind ("Trapping Mechanismus"). Sollte diese Stimulierung des Transports vergleichbar sein, zu der unter ppL-Bedingungen, so kann man daraus schließen, dass auch im Fall von ppL die Stimulierung des Transports von pL56 durch Avidin geringer sein als die von pL, so kann man daraus schließen, dass ein Teil der Stimulierung beim Einsatz von ppL auf dem "Ratchet Mechanismus" beruht. Würde keine Transporteffizienzerhöhung bei dem Transport von ppL86mer beobachtet, so würde dies bedeuten, dass die naszierende Ketten duch den "Ratchet Mechanismus" in das Lumen transportiert werden. Bei ppL wäre die Transporteffizienzerhöhung nur auf den "Ratchet Mechanismus" durch Avidin zurückzuführen.



Abb. 18 : Darstellung des Verlaufs des cotranslationalen Transports von Biotin-ppL86mer in Proteoliposomen mit Avidin Erläuterung: siehe Text

Durch den Vergleich der Transporteffizienzen beim Transport von ppL und ppL86mer kann somit zwischen den beiden potentiellen Wirkmechanismen von BiP unterschieden werden.

#### Quantifizierung der Transporteffizienz

Um die Effizienz des Transports quantifizieren zu können, wird die Methode der Sequestrierung angewendet (siehe II.7.2). Dafür wird ein Transportansatz in drei Aliquots geteilt:

Dem Ersten wird Saccharose-Lösung zugegeben und dieses gilt als Kontrolle (siehe Abb. 19). Die Analyse dieser Probe zeigt sowohl das unprozessierte ppL bzw. ppL86mer, als auch alle prozessierten pL- bzw. pL56-Ketten. Diese können sich sowohl fertig transportiert im Lumen der Vesikel, als auch außerhalb der Vesikel, durch retrograden Transport oder Export hierher gelangt, befinden. Da bei der Herstellung der Proteoliposomen statistisch die Hälfte der Membranproteine mit der Innenseite nach Aussen vorliegen können, könnte auch ein Teil der pL bzw. pL56 von Signal Peptidase, die sich an der Oberfläche der Vesikel befindet, prozessiert worden sein. Die Gesamtmenge der prozessierten Ketten wird als 100 % angenommen.

Dem zweiten Aliquot wird Proteinase-K-Lösung zugegeben (siehe Abb. 19). Hier werden alle Proteine außerhalb der Vesikel von der Proteinase verdaut. Nach der Analyse bekommt man eine Bande zu sehen, die den Anteil der im Lumen geschützten pL-Ketten repräsentiert. Dieser Anteil ist X % der gesamten prozessierten pL- bzw. pL56-Ketten und drückt die Effizienz des Transportprozesses aus.

Um eine mögliche Proteinase-K-Resistenz der synthetisierten Proteine auszuschließen, wird dem dritten Aliquot eine Lösung aus Proteinase-K und Triton X-100 zugegeben. Das Triton solubilisiert die Membran der Vesikel, mit der Folge, dass die Proteinase-K auch die sich im Lumen befindlichen Proteine verdauen kann. Nach der Analyse dieser Probe sollte, bei fehlender Proteinaseresistenz, keine Bande mehr zu sehen sein.

In den nachfolgenden Versuchen wurden drei verschiede Arten von Proteoliposomen eingesetzt (siehe II.5.2). Neben den Proteoliposomen mit Avidin (PL+Av) wurden auch "leere" Proteoliposomen (PLØ), das heißt Proteoliposomen, die keine zusätzlichen ER-luminalen Proteine enhalten, und Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP) (siehe II.5.1), das heißt mit ER-luminalen Proteinen, verwendet. Der Einsatz der leeren Proteoliposomen diente dabei zu Berechnung des minimalen Transports, wenn keine zusatzlichen ER-luminalen Proteine bzw. Avidin anwesend waren, und somit keine Stimulation des Transports zu erwarten war.

93

Die Proteoliposomen mit RP dienten als Positivkontrolle der Herstellung der Proteoliposomen, hier führten die luminalen Komponenten zu einer maximalen Stimulation des Transports. Als Positivkontrolle für die Synthese- und Transportreaktion wurde parallel ein Translationsansatz mit Hundepankreasmikrosomen durchgeführt.



# Abb. 19 : Verlauf eines Sequestrierungstests und Darstellung der radioaktiven Signale nach Phosphorimaging

Ein Transportsansatz wird in drei Aliquots geteilt. Dem als "Kontrolle" bezeichneten Aliquot wird Sucrose-Lösung zugegeben. Alle ppL- und prozessierten pL-Ketten sind in dieser Probe anwesend. Dem zweiten Aliquot wird Proteinase K zugegeben (PK), alle Proteine außerhalb der Vesikel werden verdaut. Dem dritten Aliquot wird Proteinase K und Detergens zugegeben (PK / TX-100). Die Membranen werden solubilisiert und alle Proteine von der Proteinase verdaut. Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Banden nach Phosphorimaging, nach SDS-PAGE der Proben. Die pL-Bande in der Kontrolle wird als 100 % gesetzt. Davon wird in der PK-Probe X % berechnet, welches den Anteil der geschützten pL darstellt und die Effizienz des Transportprozesses widerspiegelt. Nach der Solubilisierung der Vesikel und Verdauung durch die Proteinase sollte kein Signal erscheinen.

### III.1.2 Avidin unterstützt den Transport von nicht biotinyliertem ppL in Proteoliposomen nicht

Um die Anwendbarkeit des Systems der Proteoliposomen mit Avidin zu prüfen, war es zunächst notwendig zu untersuchen, ob in Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin die Transporteffizienz von nicht biotinyliertem ppL erhöht.

Dafür wurden "leere" Proteoliposomen, Proteoliposomen mit Retikuloplasma und Proteoliposomen mit Avidin hergestellt (siehe II.5.2). Es wurde ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem ppL pipettiert und aliquotiert (siehe II.7.1). Jedem Aliquot wurde entweder Puffer (Negativkontrolle), Hundepankreasmikrosomen (RM) oder eine der Proteoliposomen-Arten zugegeben. Während der Inkubation der Ansätze erfolgte in den Vesikeln der cotranslationale Transport der zu synthetisierenden ppL-Ketten. Um diesen Prozess zu verfolgen wurde jeweils ein Sequestrierungstest durchgeführt und die Reaktion nach einer SDS-PAGE durch Phosphorimaging analysiert (siehe Abb. 20).

In der Abb. 20 A sind jeweils die Saccharose-Kontrollen ("KONTROLLE") sowie die Proteinase K-behandelten Aliguots (PK) des Seguestrierungstests gezeigt. Aliguots, die mit Proteinase K und TritonX-100 behandelt wurden, zeigten keine Signale für die Vorläuferproteine ([<sup>35</sup>S]-ppL) oder die prozessierte Form ([<sup>35</sup>S]-pL) (Daten nicht gezeigt, siehe aber Abb. 21). In Abwesenheit von Membranen war das synthetisierte [<sup>35</sup>S]-ppL, aber keine prozessierte Form erkennbar (Spur 1). In Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen oder den drei verschiedenen Arten von Proteoliposomen war ein Teil des Vorläuferproteins prozessiert (Spuren 2-8). Nach Behandlung mit Proteinase K war in Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen der größte Teil des gebildeten reifen Proteins geschützt (Spur 10), während in den verschiedenen Arten von Proteoliposomen der Anteil des reifen pL, welcher geschützt war, unterschiedlich war (Spuren 11-16). Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltens wurden die Bandenintensitäten des reifen Proteins in den Saccharosekontrollen (Spuren 2-8) sowie in den Proteinase K-behandelten Aliguots (Spuren 10-16) mit Hilfe der Image-Quant-Software ermittelt. In der Abb. 20 B ist die Transporteffizienz als Menge des geschützten [<sup>35</sup>S]-pL in Prozent bezüglich des gesamt prozessierten [<sup>35</sup>S]-pL in Form von Balkendiagrammen wiedergegeben (siehe Abb. 20 B).

95



#### Abb. 20 : Transport von radioaktivem und nicht biotinyliertem ppL ([<sup>35</sup>S]-ppL) in Hundepankreasmikrosomen und verschiedene Proteoliposomen.

Es wurden leere Proteoliposomen (PL Ø), Proteoliposomen mit zwei verschiedenen Konzentrationen Retikuloplasma (PL+RPa bzw. PL+RPb (2,0 mg/ml bzw. 3,3 mg/ml RP im Ansatz)) und Proteoliposomen mit drei verschiedenen Konzentrationen (0,16, 0,24 und 0,32 mM) Avidin (PL+Av) hergestellt (siehe II.5.2). Ein Translationsansatz mit Retikulozytenlysat Typ II wurde vorbereitet (siehe II.7.1). Den für 1 h mit Biotin vorinkubierten Vesikeln (Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1) und Proteoliposomen) bzw. Puffer wurde jeweils ein Aliquot des Translationsansatzes zugegeben. Diese Ansätze wurden nun für 60 min bei 30°C inkubiert und anschließend einem Sequestrierungstest unterzogen (siehe II.7.2). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe II.3.2) und mittels Phosphorimaging (siehe II.3.7) analysiert. **A)** Bild nach Phosphorimaging-Analyse der Proben. In der Abbildung, links unter "Kontrolle", sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliquots gezeigt. Rechts unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots gezeigt. **B)** Auswertung der Transporteffizienz in den jeweiligen Vesikeln. Die linke Abbildung zeigt die Transporteffizienz des in Mikrosomen (RM) transportierten [<sup>35</sup>S]-ppL. Die rechte Abbildung zeigt die Transporteffizienz des in die verschiedenen Proteoliposomen transportierten [<sup>35</sup>S]-ppL.

Die hohe Transporteffizienz der Mikrosomen, deren Einsatz als Positivkontrolle der Transportreaktion diente, zeigt, dass der Versuch unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Transporteffizienz der leeren Proteoliposomen betrug 20 %, im Gegensatz zu 43-46 % Transporteffizienz der Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP). Somit transportierten die letzten ungefähr doppelt so viele pL-Ketten als die leeren Proteoliposomen. Da die zusätzlichen luminalen Proteine den einzigen Unterschied zwischen den leeren und den mit Retikuloplasma gefüllten Proteoliposomen darstellen, ist die Transporteffizienzerhöhung auf diese zurückzuführen. Die Proteoliposomen mit Avidin zeigten dagegen eine Transporteffizienz von 16-22 % und damit keine signifikante Stimulation des Transports. Die Proteoliposomen mit Retikuloplasma stellen eine Positivkontrolle für die Herstellung der Proteoliposomen dar. Die Erhöhung der Transporteffizienz ihrerseits deutet auf das erfolgreiche Einschließen der Proteine in die Vesikel während des Herstellungsprozesses hin. Daher ist der fehlende Effekt von Avidin nicht auf einen technischen Fehler zurückzuführen. Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass das in Proteoliposomen eingeschlossene Avidin keinen Effekt auf den Transport des nicht biotinylierten ppL hat.

# III.1.3 In Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin unterstützt den Transport von biotinyliertem ppL

Nachdem die Möglichkeit eines falsch positiven Ergebnisses unter Verwendung des Systems der Proteoliposomen mit Avidin ausgeschlossen worden war, wurde das System zunächst zur Untersuchung des Transports von biotinyliertem ppL verwendet. Dieses sollte zur Berechnung der Stimulation des Transports durch Avidin dienen, wenn die Avidin-Biotin-Interaktion durch "Ratchet Mechanismus" und/oder "Trapping Mechanismus" erfolgen könnte (siehe III und Abb. 17).

Dazu wurde der Transport von biotinyliertem ppL in Mikrosomen (siehe II.1.9.1) und unterschiedliche Proteoliposomen untersucht. Die *in vitro*-Synthese des Proteins erfolgte im zur Biotinylierung bestimmten Retikulozytenlysat (Roche) unter Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin, um eine Doppelmarkierung des Proteins zu erreichen (siehe II.6.2.2). Der Versuch wurde ansonsten wie unter III.1.2 beschrieben durchgeführt und analysiert (siehe Abb. 21).

97





Es wurden leere Proteoliposomen (PL Ø), Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP) und Proteoliposomen mit Avidin (PL+Av) hergestellt (4,7 mg/ml RP bzw. 0,24 mM Avidin-Endkonzentration im Herstellungsansatz) (siehe II.5.2). Ein Translationsansatz mit Retikulozytenlysat für Biotinin vitro-Translation wurde unter Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin für die Synthese von doppelmarkiertem ppL angesetzt (siehe II.6.2.2). Den für 1 h mit Biotin vorinkubierten Vesikeln (Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1) und Proteoliposomen) bzw. Puffer wurde jeweils ein Aliguot des Translationsansatzes zugegeben. Diese Ansätze wurden nun für 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend einem Sequestrierungstest unterzogen (siehe II.7.2). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe II.3.2) und mittels Phosphorimaging (siehe II.3.7) analysiert. A) Bild der Proben nach Phosphorimaging-Analyse. In der Abbildung links, unter "Kontrolle" sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliquots gezeigt. In der Mitte unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots gezegt. Rechts vom Bild sind die mit Proteinase K und TritonX-100 (PK / TX-100) behandelten Aliguots gezeigt. B) Auswertung der Transporteffizienz (mit Standardabweichung) in den jeweiligen Vesikel von vier voneinander unabhängigen Versuchen. Die linke Grafik zeigt die Transporteffizienz des in Mikrosomen (RM) transportierten [<sup>35</sup>S]-BiotinppL. Die rechte Grafik zeigt die Transporteffizienz des in die verschiedenen Proteoliposomen transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL, sowie die Stimulation des Transports bei PL+RP und PLØ als Faktor (in Bezug auf die leere Proteoliposomen) ausgedruckt.

In der Abb. 21 A sind jeweils die Saccharose-Kontrollen ("KONTROLLE") sowie die Proteinase K- und Proteinase K/TritonX-100-behandelten Aliquots ("PK" bzw. "PK/TX-100") des Sequestrierungstests gezeigt. Aliquots, die mit Proteinase K und TritonX-100 behandelt wurden, zeigten keine Signale für die Vorläuferproteine ([<sup>35</sup>S]-ppL) oder die prozessierte Form ([<sup>35</sup>S]-pL) (Spuren 11-15). Wie im vorheri-
gen Versuch war in Abwesenheit von Membranen das synthetisierte [<sup>35</sup>S]-ppL, aber keine prozessierte Form erkennbar (Spur 1). In Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen oder den drei verschiedenen Arten von Proteoliposomen war ein Teil des Vorläuferproteins prozessiert (Spuren 2-5). Nach Behandlung mit Proteinase K war in Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen der größte Teil des gebildeten reifen Proteins geschützt (Spur 7), während in den verschiedenen Arten von Proteoliposomen der Anteil des reifen pL, welcher geschützt war, unterschiedlich war (Spuren 8-10). Die Bandenintensitäten des reifen [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL in den Saccharosekontrollen (Spuren 2-5) sowie in den Proteinase K-behandelten Aliquots (Spuren 7-10) wurden mit Hilfe der Image-Quant-Software ermittelt. In der Abb. 21 B ist die Transporteffizienz in Form von Balkendiagrammen wiedergegeben.

Der Mittelwert (aus vier voneinander unabhängingen Versuchen) der Transporteffizienz der Mikrosomen betrug 76 %, das heißt, dass sich dieser Prozentsatz an prozessierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL-Ketten im Lumen der Mikrosomen vor der proteolytischen Aktivität der Proteinase K geschützt befand. Das Ergebnis für die Mikrosomen zeigte in allen vier Versuchen, dass die Bedingungen für die Transportreaktion optimal waren.

Die Transporteffizienz der leeren Proteoliposomen betrug etwa 40 % im Gegensatz zu ca. 70 % Transporteffizienz der Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP). Diese Erhöhung der Transporteffizienz beruhte auf den in den Proteoliposomen eingeschlossenen luminalen Proteinen (Retikuloplasma, siehe II.5.1) und entsprach einem 1,7-fach besseren Transport. Die Proteoliposomen mit Avidin zeigten eine Transporteffizienz von 60 %, was einen 1,5-fach verbesserten Transport im Vergleich zu den leeren Proteoliposomen darstellte. Somit hatte das in den Proteoliposomen eingeschlossene Avidin einen Effekt auf den Transport der biotinylierten ppL-Ketten. Diese Stimulation um den Faktor 1,5 wurde für die folgenden Experimente als 100 % des Effekts des Avidins betrachtet und ist Ausdruck des durch den "Ratchet Mechanismus" und/oder "Trapping Mechanismus" unterstützten Transports (siehe Abb. 17).

### III.1.4 In Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin unterstützt den Transport von biotinyliertem ppL86mer nur wenig

Im vorherigen Versuch wurde die Stimulation des Transports von biotinyliertem ppL in verschiedene Proteoliposomen untersucht. Bei diesem Protein beruht diese Stimulation auf einem möglichen "Ratchet Mechanismus" und/oder "Trapping Mechanismus". Nun wurde der Transport von ppL86mer untersucht. Hier kann eine Stimulation des Transports durch in Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin nur auf den "Trapping Mechanismus" zurückzuführen sein. Der Vergleich zwischen der Stimulation des Transports durch Avidin von beiden Proteinen offenbart, welcher Anteil der Stimulation des Transports von ppL auf dem "Trapping Mechanismus" beruht.

Der Transport von biotinyliertem ppL86mer in Mikrosomen (siehe II.1.9.1) und unterschiedliche Proteoliposomen wurde wie in III.1.2 durchgeführt und analysiert (siehe Abb. 22). Dabei erfolgte die *in vitro*-Synthese des Proteins im zur Biotinylierung bestimmten Retikulozytenlysat unter Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin zur Doppelmarkierung des Proteins (siehe II.6.2.2).

In der Abb. 22 A sind jeweils die Saccharose-Kontrollen ("KONTROLLE") sowie die Proteinase K- und Proteinase K/TritonX-100-behandelten Aliquots ("PK" bzw. "PK/TX-100") des Sequestrierungstests gezeigt.

Aliquots die mit Proteinase K und TritonX-100 behandelt wurden, zeigten keine Signale für die Vorläuferproteine ([<sup>35</sup>S]-ppL86) oder die prozessierte Form ([<sup>35</sup>S]pL56) (Spuren 11-15). In Abwesenheit von Membranen war das synthetisierte [<sup>35</sup>S]-ppL86, aber keine prozessierte Form erkennbar (Spur 1). In Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen oder den drei verschiedenen Arten von Proteoliposomen war ein Teil des Vorläuferproteins prozessiert (Spuren 2-5). Nach Behandlung mit Proteinase K war in Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen der größte Teil des gebildeten reifen Proteins geschützt (Spur 7), während in den verschiedenen Arten von Proteoliposomen der Anteil des reifen pL, welcher geschützt war, unterschiedlich war (Spuren 8-10). Die Bandenintensitäten mit reifem [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL in den Saccharosekontrollen (Spuren 2-5) sowie in den Proteinase K-behandelten Aliquots (Spuren 7-10) wurden mit Hilfe der Image-Quant-Software ermittelt und die Transporteffizienz der verschiedenen Vesikel berechnet (siehe III.1.1) und in der Abb. 22 B in Form von Balkendiagrammen wiedergegeben.



#### Abb. 22 : Transport von biotinyliertem ppL86mer in Hundepankreasmikrosomen und verschiedene Proteoliposomen

Es wurden leere Proteoliposomen (PL Ø), Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP) und Proteoliposomen Avidin (PL+Av) hergestellt (4,7 mg/ml RP bzw. 0,24 mM Avidin-Endkonzentration im Herstellungsansatz) (siehe II.5.2). Ein Translationsansatz mit Retikulozytenlysat für Biotin-in vitro-Translation wurde unter Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin für die Synthese von doppelmarkiertem ppL86mer vorbereitet (siehe II.6.2.2). Den für 1 h mit Biotin vorinkubierten Vesikeln (Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1) und Proteoliposomen) bzw. Puffer wurde jeweils ein Aliquot des Translationsansatzes zugegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation der Ansätze bei 30°C wurde diesen jeweils Puromycin-Lösung zugegeben (siehe II.7.1) und für weitere 15 min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Test auf Sequestrierung (siehe II.7.2). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe II.3.2) und mittels Phosphorimaging (siehe II.3.7) analysiert. A) Bild nach Phosphorimaging-Analyse der Proben. In der Abbildung links unter "Kontrolle" sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliquots gezeigt. In der Mitte, unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots gezeigt. Rechts im Bild sind die mit Proteinase K und TritonX-100 (PK / TX-100) behandelten Aliguots gezeigt. B) Auswertung der Transporteffizienz (mit Standardabweichung) in den jeweiligen Vesikeln von zwei voneinander unabhängigen Vesuchen, die parallel (gleiche Proteoliposomen, Hundepankreasmikrosomen und Translationsansätze verwendet) zu zwei der Versuche, die in III.1.3 dargestellt sind, durchgeführt wurden. Die linke Grafik zeigt die Transporteffizienz des in Mikrosomen (RM) transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL. Die rechte Grafik zeigt die Transporteffizienz des in die verschiedenen Proteoliposomen transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL, sowie die Stimulierung des Transports bei PL+RP und PLØ als Faktor (in Bezug auf die leere Proteoliposoen) ausgedrückt.

Die hohe Transporteffizienz der Mikrosomen, deren Einsatz als Positivkontrolle der Transportreaktion diente, zeigt, dass der Versuch unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde.

Mit einer Transporteffizienz von 65 % transportierten die Proteoliposomen mit Retikuloplasma mehr als die zweifache Menge von Biotin-pL56 als die leeren Proteoliposomen (Transporteffizienz von 30 %).

Die Proteoliposomen mit Avidin zeigten dagegen eine Transporteffizienz von 34 %, was eine Stimulation des Transports um den Faktor 1,1 im Vergleich zu den leeren Proteoliposomen bedeutete. Da bei [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86 die Interaktion Avidin-Biotin nur nach der vollständigen Translokation der biotinylierten Ketten in das Lumen der Vesikel erfolgen kann, beruht diese Stimulation um den Faktor 1,1 auf dem "Trapping Mechanismus".

Im vorherigen Versuch bewirkte Avidin eine Stimulation des Transports von [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL um den Faktor 1,5 in Bezug auf die leeren Proteoliposomen. Diese kann sowohl auf einen "Ratchet-" als auch auf einen "Trapping Mechanismus" zurückzuführen sein (siehe III.1.3). Der Versuch mit [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86mer zeigt, dass der "Trapping Mechanismus" eine Stimulation des Transports um den Faktor 1,1 bewirkt. Wird die Stimulierung von 1,5 x (bei ppL) als 100 % der gesamten Aktivität des Avidins betrachtet, so würde eine Stimulation von 1,1 x (bei ppL86mer) einen Anteil von 20 % der gesamten Avidin-Aktivität bedeuten. Somit wären 20 % des Effekts von Avidin auf das biotinylierte ppL auf den "Trapping Mechanismus" und die restlichen 80 % auf den "Ratchet Mechanismus" zurückzuführen.

Man muss aber bemerken, dass es für die Beurteilung dieses Ergebnisses wichtig ist, den Biotinylierungsgrad von ppL und ppL86mer zu berücksichtigen. Um diesen zu überprüfen, wurden die nächsten Versuche durchgeführt.

### III.1.5 Die Biotinylierung von ppL und ppL86mer ist nicht vollständig und unterschiedlich für beide Proteine

Um den Effekt des Avidins auf den Transport von ppL und ppL86mer vergleichen zu können, muss der Prozentsatz der biotinylierten Ketten für beide Proteine vergleichbar sein. Durch Hoeltke et al. (1995) wurde das hier für die Biotin-*in vitro*-Translation verwendete Retikulozytenlysat getestet, und es wurde beschrieben, dass jeder dritte oder vierte Lysinrest der verwendeten Proteine biotinyliert wird.

Da das in dieser Arbeit verwendete ppL neun mögliche Lysinreste für die Biotinylierung hat (die Signalsequenz wird ausgenommen (siehe Abb. 16)), wäre davon auszugehen, dass jede ppL-Kette biotinyliert wird. Im Fall von ppL86mer sind nur zwei Lysinreste (die Signalsequenz wird ausgenommen) für die Biotinylierung vorhanden, und daher könnte es sein, dass ein Teil der Ketten nicht markiert wird. Wäre dies der Fall, so könnte ein Teil der pL56-Ketten, obwohl sie ins Lumen gelangen, durch die fehlende Biotinylierung nicht vom Avidin gebunden werden, was sich in einer verminderten Stimulation des Transports durch "trapping" der Ketten ausdrücken würde. Um auf diese Problematik einzugehen und genauere Daten über die Biotinylierung des hier verwendeten ppL und ppL86mer zu bekommen, wurde ein Translationsansatz für die Synthese von biotinyliertem bzw. biotinyliertem und radioaktiv markiertem (doppelt markiertem) ppL bzw. ppL86mer vorbereitet (siehe II.6.2.2) Nach der Synthese wurden die jeweiligen biotinylierten Proteine mittels "Streptavidin-Magneticbeads" von den nicht biotinylierten in "Gebunden" und "Ungebunden" getrennt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die biotinylierten Proteine durch Westernblot (siehe II.3.5) durch die Zugabe von Streptavidin-POD detektiert (siehe Abb. 23 A und C), die doppeltmarkierten ppL bzw. ppL86mer wurden mittels Phosphorimaging analysiert (siehe II.3.7), wobei hier nur die radioaktive Markierung sichtbar gemacht wird (siehe Abb. 23 A und C).

Die Westernblotanalyse für Biotin-ppL (siehe Abb. 23 A) zeigt, dass quasi alle biotinylierten Ketten an die Streptavidin-Beads gebunden haben. Die biotinylierten Ketten, die in der Fraktion "Ungebunden" nach der Zugabe von 50 µl "Magneticbeads" nachweisbar sind (Spur 4), binden fast vollständig, nachdem die Beadmenge auf 100 µl erhöht wurde. Trotz doppelter Menge an Beads bleibt ein minimaler Prozentsatz biotinylierter Ketten im Lysat. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bei diesen ppL-Ketten die Erreichbarkeit der Biotinylierung durch die Konformation des Proteins im Lysat beinträchtigt wird. Erst nach der Denaturierung dieser Ketten im SDS-Polyacrylamidgel werden die Biotinylierungen von dem Streptavidin-POD bei der Dekoration des Westernblots gebunden. Bei BiotinppL86mer zeigt die Analyse durch Westernblot, dass alle biotinylierten Ketten in Gegenwart von100 µl "Streptavidin-Magneticbeads" gebunden werden (siehe



Abb. 23 : Untersuchung der Biotinylierung von Präprolaktin (ppL) und Präprolaktin86mer (ppL86mer)

Ein Translationsansatz für Biotin-*in vitro*-Translation ohne mRNA und [<sup>35</sup>S]-Methionin wurde angesetzt (siehe II.6.2.2). Er wurde in zwei Aliquots geteilt und jeweils mRNA für die Synthese von ppL bzw. ppL86mer dazugegeben. Jedes der Aliguots wurde wieder geteilt und jeweils Wasser (für die Synthese von Biotin-ppL bzw. Biotin-ppL86) bzw. [<sup>35</sup>S]-Methionin (für die Synthese von doppeltmarkiertem ppL bzw. ppL86mer) dazugegeben. Die so hergestellten Translationsansätze wurden für 15 min bei 30°C inkubiert. Jeder Translationsansatz wurde in drei Aliquots geteilt, wobei das erste 1/3 des Volumens darstellte. Dem zweiten und dem dritten Aliguot wurden 50 bzw.100 µl "Streptavidin-Magneticbeads" ("Beads") zugegeben. Sie wurden für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads von dem Lysat getrennt. Die jeweiligen Lysate ("Ungebunden"), die Beads ("Gebunden"), und das erste Aliqout ("1/3 Auftrag") wurden mit Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und jeweils mittels SDS-PAGE (siehe II.3.2; 15 % Polyacrylamidgel für ppL, 19,4% Harnstoff-Polyacrylamidgel für ppL86mer) aufgetrennt (es wurde 1/6 der jeweiligen Lysate auf das Gel aufgetragen). Biotin-ppL und Biotin- ppL86mer wurden mittels Westernblot mit Streptavidin-POD analysiert. Die doppeltmarkierten ppL bzw. ppL86mer wurden durch Phosphorimaging analysiert A) Oben Westernblotanalyse von Biotin-ppL und unten Phosphorimaging des doppeltmarkierten ppL. B) Quantifizierung des Anteils der ppL-Ketten, der an die Beads gebunden hat und des Anteils, der im Lysat ungebunden geblieben ist. C) Oben Westernblotanalyse von BiotinppL86mer und unten Phosphorimaging des doppelmarkierten ppL86mer. D) Quantifizierung des Anteils der ppL86mer-Ketten, der an die Beads gebunden hat und des Antils, der im Lysat ungebunden geblieben ist.

Abb. 23 C Spur 3). Da in diesem Fall keine biotinylierten Ketten in der entsprechenden "Ungebundenen" Fraktion nachweisbar sind (Spur 5), ist daraus zu schließen, dass die Konformation des ppL86mer im Lysat für die Bindung der Streptavidinbeads nicht von Bedeutung ist.

Die Phosphorimaginganalysen zeigen, dass sowohl für ppL als auch für ppL86mer ein großer Anteil der Ketten in der Fraktion "Ungebunden" geblieben ist (Spur 4-5). Da die Westernblotanalyse die Vollständigkeit der Bindung der biotinylierten Ketten durch die Beads zeigt, kann man daraus schließen, dass die ungebundenen Ketten (der größte Teil im Fall von ppL) nicht mit Biotin markiert sind. Die Spuren 2 und 3 der Phosphorimaginganalyse stellen den Anteil der radioaktiv markierten Proteine dar, die auch biotinyliert wurden und daher an die Beads gebunden haben. Die Quantifizierung der Banden in der Fraktion "Gebunden" und der Fraktion "Ungebunden" ergibt den Prozentsatz der Ketten, die eine oder mehrere Biotinylierungen haben, gegenüber den Ketten, die nicht biotinyliert und nur radioaktiv markiert worden sind (siehe Abb. 23 B und D). Bei einem in vitro-Translationsansatz für die Synthese unter Doppelmakierung von ppL werden nach einer 15 minütigen Inkubation ca. 40 % der Ketten sowohl biotinyliert als auch radioaktiv markiert. Die restlichen 60 % der Ketten verbleiben nur radioaktiv markiert. Im Fall von ppL86mer reduziert sich die Anzahl der für die Biotinylierung möglichen Lysinreste, und somit wird eine Doppelmarkierung von ca. 20 % der gesamten radioaktiven Ketten erreicht. Die Tatsache, dass Ketten ohne Biotinylierung synthetisiert werden, bestätigt die Anwesenheit von endogenem Lysin und Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> im Retikulozytenlysat (Hoeltke et al., 1995).

### III.1.6 Zusätzliches Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> im Translationsansatz verbessert die Biotinylierung und verlangsamt die Synthese von doppelmarkiertem Präprolaktin

Im vorherigen Versuch (siehe III.1.5) wurde festgestellt, dass die Biotinmarkierung der synthetisierten Proteine nicht vollständig war, darüberhinaus blieb ein signifikanter Prozentsatz der synthethisierten Ketten ohne Biotinylierung nur radioaktiv markiert. Der festgestellte Unterschied zwischen der Biotinylierungsrate von doppeltmakiertem ppL und ppL86mer weist den direkten Vergleich des Effekts des in Proteoliposomen eingeschlossenen Avidins auf die Transporteffizienz der zwei

Proteine als ungenau aus. Es wurde nun untersucht, ob die Zugabe von zusätzlicher Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> im Lysat die Biotinylierungsrate verbessert. Dafür wurden neben der Standardkonzentration von 0,2 µM Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> im Translationsansatz zwei höhere Konzentrationen von 0,4 und 0,8 µM Biotin-LysintRNA<sup>Lys</sup> getestet. Nach der Inkubation der Ansätze wurden "Streptavidin-Magneticbeads" dazugegeben, um den biotinylierten Anteil der ppL-Ketten von





Ein Translationsansatz für Biotin-*in vitro*-Synthese wurde unter Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin angesetzt (siehe II.6.2.2), er wurde in drei Aliquots geteilt und dem zweiten und dritten zusätzliches Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> zugegeben, so dass die Endkonzentration 0,4 bzw 0,8 µM betrug. Die Ansätze wurden für 15 min bei 30°C inkubiert, dann in jeweils zwei Aliquots geteilt, wobei das erste 1/3 des Volumens betrug und für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurde ("1/3 Auftrag"). Dem zweiten Aliquot wurde jeweils 120 µI "Streptavidin-Magneticbeads" (Beads) zugegeben und für 60 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads von dem Lysat getrennt. Die jeweiligen Lysate ("Ungebunden") und die Beads ("Gebunden") wurden für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet (siehe II.3.2). Es wurde 1/4 der jeweiligen Lysate auf das Gel aufgetragen. Das Ergebnis wurde mittels Phosphorimaging ermittelt (siehe II.3.7). **A**) Phosphorimagingbild des doppeltmarkierten ppL. **B**) Quantifizierung des synthetisierten ppL, das biotinyliert und/oder radioaktiv markiert ist. **C**) Quantifizierung des Anteils der ppL-Ketten, der an die Beads gebunden hat und des Anteils, der im Lysat ungebunden geblieben ist. dem nur radioaktiv markierten zu trennen. Auftrag, Fraktion "Gebunden" und Fraktion "Ungebunden" wurden einer SDS-PAGE unterzogen und mittels Phosphorimaging analysiert (siehe Abb. 24 A).

Die Analyse zeigt, wie sich bei steigenden Konzentrationen von Biotin-LysintRNA<sup>Lys</sup> im Translationsansatz die Menge an synthethisiertem ppL reduziert (siehe Abb. 24 A Spuren 1-3 und B). In Anwesenheit von mehr markierter tRNA<sup>Lys</sup> ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass diese tRNA<sup>Lys</sup> von den Ribosomen genommen wird und die Verknüpfung zwischen dem biotinylierten Lysin und dem vorhergehenden Aminosäurerest katalysiert wird. Bei der Betrachtung des ppL-Anteils, der bei den unterschliedlichen Konzentrationen an markierten tRNA<sup>Lys</sup> an die Streptavidin-Beads gebunden hat (Abb. 24 A Spuren 4-6), sieht man, dass die Banden konstant bleiben. Die Menge an biotinyliertem ppL steigt nicht. Trotzdem wird der Anteil der nicht gebundenen ppL-Ketten bei steigenden Konzentrationen an markierten tRNA<sup>Lys</sup> geringer (Abb. 24 A Spuren 7-9), daher erhöht sich der Prozentsatz des gebundenen Anteils, das heißt, des biotinylierten ppL, im Vergleich zum gesamten Protein (siehe Abb. 24 C).

Die durch die Zugabe von Biotin-Lys-tRNA<sup>Lys</sup> optimierte Biotinylierung wurde nun in den folgenden Versuchen angewendet.

# III.1.7 Der "Ratchet Mechanismus" spielt die Hauptrolle bei derStimulierung des Transports von Biotin-ppL durch Avidin

Es wird untersucht, auf welchem der zwei Mechanismen, "Ratchet" oder "Trapping", die Stimulation des Transports von biotinyliertem ppL beruht. Dafür wird die Stimulation des Transports von biotinyliertem ppL bzw. ppL86mer in Proteoliposomen (siehe II.5.2) durch in diese eingeschlossenes Avidin verglichen (siehe III). Um einen direkten Vergleich möglich zu machen, muss die Biotin-Markierung für beide Proteine vergleichbar sein. In III.1.5 wurde festgestellt, dass die Biotinylierung von ppL und ppL86mer sowohl nicht vollständig als auch nicht direkt vergleichbar war. In III.1.6 konnte die Biotinylierung der synthethisierten ppL-Ketten durch die Zugabe von Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> im Retikulozytenlysat optimiert werden. Trotzdem war dieses nicht ausreichend, um eine vollständige Biotinylierung zu erreichen. Es musste also ein System verwendet werden, das ausschließlich die Untersuchung des cotranslationalen Transports der radioaktiven <u>und</u> mit Biotin markierten Proteine erlaubt.

Um den cotranslationalen Transport von ppL bzw. ppL86mer zu untersuchen, wurden "leere" Proteoliposomen, Proteoliposomen mit RP und Proteoliposomen mit Avidin hergestellt (siehe II.5.2). Es wurde ein Translationsansatz für die in vitro-Synthese von radioaktiv und mit Biotin markiertem ppL bzw. ppL86 angesetzt und aliquotiert (siehe II.7.1). Jedem Aliquot wurde entweder Hundepankreasmikrosomen (RM) oder eine der Proteoliposomen-Arten zugegeben. Während der Inkubation der Ansätze erfolgte in den Vesikeln der cotranslationale Transport der zu synthetisierenden ppL- bzw. ppL86-Ketten. Um diesen Prozess zu verfolgen wurde jeweils ein Sequestrierungstest durchgeführt (siehe II.6.2.2). Um die doppeltmarkierten ppL- und pL-Ketten bzw. ppL86- und pL56-Ketten von den nur radioaktiv makierten zu trennen, wurden nach dem Sequestrierungstest die Vesikel mit einem Detergens solubilisiert und anschließend "Streptavidin-Magneticbeads" dazugegeben. Die Streptavidin Moleküle stellen ein Homotetramer aus Avidin dar und interagieren daher mit den mit Biotin markierten Ketten. Nach der Inkubation mit den Beads wurden jeweils zwei Fraktionen mit den an die Beads gebundenen, biotinylierten Proteinen und den ungebundenen, nicht-biotinylierten Proteinen gewonnen. Sie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Phosphorimaging analysiert (siehe Abb. 25).

In der Abb. 25 A und C sind jeweils die Saccharose-Kontrollen ("KONTROL-LE") sowie die Proteinase K-behandelten Aliquots des Sequestrierungstests für [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL und [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86 gezeigt.

In Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen oder den drei verschiedenen Arten von Proteoliposomen war ein Teil des Vorläuferproteins prozessiert (Spuren 1-4). Nach Behandlung mit Proteinase K war in Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen der größte Teil des gebildeten reifen Proteins geschützt (Spur 5), während in den verschiedenen Arten von Proteoliposomen der Anteil des reifen [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL bzw. [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL56, welcher geschützt war, unterschiedlich war (Spuren 5-8). Die Transporteffizienz der unterschiedlichen Vesikel wurde quantifiziert (siehe III.1.1) und in den Abb. 25 B und D als Balkendiagramme wiedergegeben. Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten des reifen [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL bzw. [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL56 in den Saccharosekontrollen (Spuren 1-4)

sowie in den Proteinase K-behandelten Aliquots (Spuren 5-8) mit Hilfe der Image-Quant-Software ermittelt.

Die hohe Transporteffizienz der Mikrosomen, deren Einsatz als Positivkontrolle der Transportreaktion diente, zeigt für beide Proteine, dass die jeweiligen Versuche unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurden.

Der Versuch mit ppL bestätigt das Ergebnis von III.1.3. Mit einer Transporteffizienz von 75 % transportierten die Proteoliposomen mit Retikuloplasma fast die zweifache Menge (Faktor 1,8) an reifem [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL als die leeren Proteoliposomen, die eine Transporteffizienz von 40 % aufwiesen (siehe Abb. 25 E).

Die Proteoliposomen mit Avidin zeigten eine Transporteffizienz von ca. 80 % und somit eine Stimulation des Transports im Vergleich zu den leeren Proteoliposomen um den Faktor 1,7. Der Effekt, der sich hier auf den Transport von [<sup>35</sup>S]-BiotinppL zeigt, ist stärker als der, der in III.1.3 erreicht wurde, denn dort wurde ein Teil des Effekts durch die Betrachtung von nicht biotinylierten Ketten maskiert.

Bei der Untersuchung des Transports von biotinyliertem ppL86mer (siehe Abb. 25 C und D) betrug die Transporteffizienz der leeren Proteoliposomen ca. 20 %. Das in den Proteoliposomen eingeschlossene Retikuloplasma (RP) (siehe II.5.1) verursachte eine Erhöhung der Transporteffizienz auf ca. 30 %, was einer Stimulation des Transports um den Faktor 1,7 entsprach, und vergleichbar mit der Stimulation beim Transport von ppL war (siehe Abb. 25 E). Die Proteoliposomen mit Avidin zeigten dagegen eine Transporteffizienz von 24 % und somit eine Stimulation des Transports im Bezug auf den leeren Proteoliposomen um den Faktor 1,3. Da bei [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86 die Interaktion Avidin-Biotin nur nach der vollständigen Translokation der biotinylierten Kette in das Lumen der Vesikel erfolgen kann, beruht diese Stimulation des Transports auf dem "Trapping Mechanismus".

Beim Transport von biotinyliertem ppL bewirkte Avidin eine Stimulation des Transports von [<sup>35</sup>S]-Biotin-pL um den Faktor 1,8. Diese könnte auf einem "Ratchet Mechanismus, und/oder auf einem "Trapping Mechanismus" beruhen (siehe III.1.3 und Abb. 17). Der parallele Versuch mit [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86mer zeigt, dass der "Trapping Mechanismus" eine Stimulation des Transports um den Faktor 1,3 bewirkt. Wird die Stimulation von 1,8 (bei ppL) als 100 % der gesamten Aktivität des Avidins betrachtet, so entspricht eine Stimulation von 1,3 (bei ppL86mer) einem An-teil von 36 % der gesamten Avidin-Aktivität. Das heißt, dass von dem gesamten





#### Abb. 25 : Transport von radioaktiv und mit Biotin markiertem ppL bzw. ppL86mer in Hundepankreasmikrosomen und unterschiedlichen Proteoliposomen

Es wurden leere Proteoliposomen (PL Ø), Proteoliposomen mit Retikuloplasma (PL+RP) und Proteoliposomen mit Avidin (PL+Av) hergestellt (4,7 mg/ml RP bzw. 0,16 mM Avidin-Endkonzentration im Herstellungsansatz) (siehe II.5.2). Ein Translationsansatz mit Retikulozytenlysat für Biotin-in vitro-Translation wurde mit Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> (Endkonzentration 1,6 µM) und [<sup>35</sup>S]-Methionin für die Synthese von doppeltmarkiertem ppL bzw. ppL86mer vorbereitet (siehe II.6.2.2). Den für 1 h mit Biotin vorinkubierten Vesikeln (Hundepankreasmikrosomen (siehe II.1.9.1) und Proteoliposomen) wurde jeweils ein Aliquot des Translationsansatzes zugegeben. Diese Ansätze wurden nun für 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend einem Sequestrierungstest unterzogen (siehe II.7.2). Nach der Inaktivierung der Proteinase K wurden die Vesikel mit Detergens für 1 h bei 4°C unter Schütteln solubilisiert. Es folgte eine Inkubation mit jeweils 240 µl "Streptavidin-Magneticbeads" für 75 min bei 4°C, wobei die Suspension in 5 minütigen Abständen kurz durch vortexen gemischt wurde. Nach dieser Inkubation wurden jeweils zwei Fraktionen mit den an die Beads gebundenen Proteinen und den ungebundenen Proteinen gewonnen. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE agetrennt (siehe II.3.2) und mittels Phosphorimaging (siehe II.3.7) analysiert. A) Bild nach Phosphorimaginganalyse der an die "Streptavidin-Magneticbeads" gebundenen ppL- und pL-Ketten. In der Abbildung links, unter "Kontrolle", sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliguots gezeigt. Rechts im Bild unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots gezeigt. B) Auswertung der Transporteffizienz des doppeltmarkierten ppL in den jeweiligen Vesikeln. Die linke Grafik zeigt die Transporteffizienz des in Mikrosomen (RM) transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL. Die rechte Grafik zeigt die Transporteffizienz des in die verschiedenen Proteoliposomen transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL, sowie die Stimulation des Transports bei PL+RP und PLØ als Faktor (in Bezug auf die leere Proteoliposomen) ausgedrückt. C) Bild nach Phosphorimaginganalyse der an die "Streptavidin-Magneticbeads" gebundenen ppL86- und pL56-Ketten. Links in der Abbildung unter "Kontrolle" sind die für den Sequestrierungstest mit Saccharose behandelten Aliquots gezeigt. Rechts im Bild unter "PK" sind die mit Proteinase K behandelten Aliquots gezeigt. D) Auswertung der Transporteffizienz des doppeltmarkierten ppL86mer in den jeweiligen Vesikeln. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche quantifiziert und die Mittelwerte mit Standard Abweichung dargestellt. Die linke Grafik zeigt die Transporteffizienz des in Mikrosomen (RM) transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86. Die rechte Grafik zeigt die Transporteffizienz des in die verschiedenen Proteoliposomen transportierten [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86 sowie die Stimulation des Transports bei PL+RP und PLØ als Faktor (in Bezug auf die leere Proteoliposomen) ausgedrückt. E) Darstellung der Stimulation der Transporteffizienz von [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL und [<sup>35</sup>S]-Biotin-ppL86 in den Proteoliposomen.

Effekt des Avidins auf das biotinylierte ppL etwa 1/3 auf den "Trapping Mechanismus" zurückzuführen ist, während die restlichen 2/3 auf dem "Ratchet Mechanismus" beruhen.

Avidin wurde als artifizieller Bindungspartner der zu transportierenden Substrate eingesetzt, um die Frage zu beantworten, welcher der zwei Mechanismen, "Ratchet" oder "Trapping", tatsächlich der Wirkungsmechanismus von BiP bei seiner Beteiligung am Transportprozess ist (siehe III). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Unterstützung des Transports durch die bindende Aktivität von BiP (Tyedmers, 2001; Tyedmers *et al.*, 2003) zu 2/3 auf den "Ratchet Mechanismus" und zu 1/3 auf den "Trapping Mechanismus" zurückzuführen ist.

### III.2 Untersuchungen zur Funktion des Säuger-Proteins Sec62p

Sec62p ist ein Membranprotein des Säuger-ER, das an dem Transport von Proteinen in das ER beteiligt sein könnte (siehe I.3.1). Es enthält in seiner Sequenz ein positiv hochgeladenes Peptid. Ähnliche Peptide in dem ER-Membranprotein Mtj1p und in SRP14 sind für die Interaktion mit Ribosomen und die regulatorische Aktivität auf die Proteinsynthese dieser Proteine essentiell (siehe I.2.2 und I.3.2).

Um die Eigenschaften von Sec62p, was eine mögliche Interaktion mit Ribosomen sowie die Beeinflussung der Proteinsynthese betrifft, zu untersuchen, wurde die N-terminale cytosolische Domäne gewählt. Sie enthält das "aktive" Peptid und stellt den Teil des Proteins dar, der in Hefe als Hauptbindungsdomäne für die Interaktion mit Sec63p bewiesen worden ist (Wittke *et al.*, 2000; Willer *et al.*, 2003b) (siehe I.3.1). Es wurde als Fusionsprotein (Sec62N-His<sub>6</sub>) mit einer C-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung in *E. coli* synthetisiert und mittels Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose isoliert (siehe II.4.1 und II.4.4).

### III.2.1 Bindungsversuche von Sec62N-His<sub>6</sub> am Ribosom

In den folgenden Abschnitten wird die Bindung der N-terminalen Domäne des Sec62p als rekombinant synthetisiertes Protein (Sec62N-His<sub>6</sub>, siehe II.4.1) an Ribosomen analysiert. Anschließend wird die Bindung der C-terminalen cytosolischen Region von Sec62p (als GST-Sec62C) an Ribosomen sowie eine mögliche Interaktion bzw. Kompetition mit Sec62N-His<sub>6</sub> untersucht (siehe III.2.1.7)

### III.2.1.1 Sec62N-His<sub>6</sub> bindet an Ribosomen

Nach der Synthese und Reinigung des Sec62N-His<sub>6</sub> wurde zunächst untersucht, ob es mit freien Ribosomen interagiert (siehe III.2). Dafür wurde ein Ribosomenbindungsversuch durchgeführt, in dem drei verschiedene Konzentrationen an Sec62N-His<sub>6</sub> eingesetzt wurden. Eine Ribosomen-Kontrolle sowie eine Protein-Kontrolle in Anwesenheit von 16 µg BSA wurden ebenfalls parallel durchgeführt (siehe II.8). Letztere diente zur Kontrolle der Stabilität des Proteins in der Reaktionslösung, um eine falsch positive Aussage über die Bindung an Ribosomen auszuschließen. Hierbei diente die Zugabe von BSA der Nachahmung der höheren Proteinkonzentration, die bei der Anweseheit der Ribosomen in den eigentlichen Bindungsversuchen herrschte). Nach der Inkubation wurden die Proben auf ein Saccharose-Kissen aufgetragen und zentrifugiert. Dann wurden Pellet und Überstand getrennt, weiter verarbeitet und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels sichtbar gemacht (siehe Abb. 26).





Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe **II.8**). Dem Ansatz ohne Ribosomen wurden zusätzlich 16  $\mu$ g BSA zugegeben. Die KCI-Konzentration aller Bindungsansätze betrug 150 mM. Die Endkonzentration von Sec62N-His<sub>6</sub> betrug 0,27  $\mu$ M (entsprechend ca. 4  $\mu$ g), 0,4  $\mu$ M und 0,7  $\mu$ M. Die Bindungsansätze wurden für 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) mittels SDS-PAGE (siehe II.3.2) aufgetrennt. Dieselbe Menge an Ribosomen wie in den Ansätzen und 2,5  $\mu$ g Sec62N-His<sub>6</sub> zusammen mit 5  $\mu$ g BSA wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) detektiert. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "- Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." bezeichnet.

In der Abb. 26 sind Auftrag (Spuren 1-2), Pellets (Spuren 3-7) und Überstände (Spuren 8-12) gezeigt. Bei der Ribosomen-Kontrolle (Puffer) wurden die Ribosomen ohne Zugabe von Protein analysiert. Der Grossteil der ribosomalen Proteine pelletierte und ist in der Pellet-Fraktion erkennbar (Spur 4). Hier kann man sehen, dass der Elongationsfaktor 2 (eEF2) auch in dieser Fraktion anwesend ist und daher mit den Ribosomen assoziiert war. Bei der eingesetzten Salzkonzentration ist im Überstand ein Teil des eEF2 erkennbar (Spur 9).

Wurden Ribosomen mit Sec62N-His<sub>6</sub> inkubiert, so erscheint in der Pellet-Fraktion eine neue Bande (im Vergleich zu der Ribosomen-Kontrolle) (Spuren 5-7) auf der Höhe des Sec62N-His<sub>6</sub> (Spur 2). Diese wird bei steigender Konzentration des Proteins grösser (Spuren 5-6), und erreicht ab einer bestimmten Menge ein Maximum, was die Sätigung der Ribosomen bedeutet (Spuren 6-7). Da nach Inkubation und Zentrifugation des Sec62N-His<sub>6</sub> in Abwesenheit von Ribosomen und auch bei höherer Proteinkonzentration nur ein minimaler Anteil des aufgetragenen Proteins pelletierte (Spur 3) und der Großteil im Überstand geblieben war (Spur 8), kann man daraus schließen, dass die Pelletierung des Sec62N-His<sub>6</sub> in Anwesenheit von Ribosomen auf eine Assoziation des Proteins mit diesen zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu der Ribosomen-Kontrolle (Spur 4) kann man bei den Ansätzen, in denen die Ribosomen mit Sec62N-His<sub>6</sub> inkubiert wurden, sehen, wie die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> an die Ribosomen die Interaktion des eEF2 mit den Ribosomen beeinflusst. Der eEF2 wird von der Pellet- (Spuren 5-7) in die Überstand-Fraktion (Spuren 10-12) verdrängt.

### III.2.1.2 Die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> an Ribosomen hat ionischen Charakter

Nicht translatierende Ribosomen binden durch Interaktion mit Membranproteinen an der ER-Membran, wobei diese Interaktion sensitiv auf hohe Salzkonzentrationen ist (Görlich *et al.*, 1992b). In Übereinstimmung damit wurde durch Ribosomenassoziationsstudien für typische ribosomenassoziierte Membranproteine wie Sec61α und Mtj1p gezeigt, dass es sich bei ihrer Bindung an Ribosomen um eine elektrostatische Interaktion handelt (Kalies *et al.*, 1994; Dudek, 2002; Dudek *et al.*, 2002). Nun wurde hier ebenfalls die Abhängigkeit der Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> an die Ribosomen von der Salzkonzentration untersucht. Dafür wurde ein Ribosomenbindungsversuch durchgeführt (siehe II.8), in denen die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> an Ribosomen im Gegensatz von nur Ribosomen (Ribosomen-Kontrolle) bei vier unterschiedlichen KCI-Konzentrationen analysiert wurde. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 27 gezeigt.

Die Protein-Kontrollen (Spuren 3-4 und 13-14) zeigen, dass in der verwendeten Salzkonzentrationsspanne im Bindungspuffer, Sec62-His<sub>6</sub> löslich bleib.

Die Ribosomen-Kontrollen zeigen bei allen verwendeten Salzkonzentrationen, dass der Grossteil der ribosomalen Proteine pelletierte (Spuren 5, 7, 9 und 11). Es ist hier zu beachten, dass bei einer KCI-Konzentration von 150 mM der eEF2 zum Teil mit den Ribosomen assoziiert (Spur 5) und zum Teil im Überstand zu finden



Abb. 27 : Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> an Ribosomen bei verschiedenen KCI-Konzentrationen Es wurden zwei Bindungsansätze ohne Ribosomen mit 150 und 300 mM KCI-Endkonzentration vorbereitet (siehe II.8). Diesen Ansätzen ohne Ribosomen wurden zusätzlich 16  $\mu$ g BSA zugegeben. Es wurden auch acht Bindungsansätze mit Ribosomen angesetzt, wobei eine Hälfte Puffer (-), die andere Sec62N-His<sub>6</sub> (+) zugegeben wurde. Hierbei wurden vier unterschiedliche KCI-Endkonzentrationen (150, 200, 250 und 300 mM) getestet. Die Endkonzentration von Sec62N-His<sub>6</sub> in allen Bindungsansätzen betrug 0,69  $\mu$ M (entsprechend ca. 10  $\mu$ g). Die Bindungsansätze wurden für 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) mittels SDS-PAGE (siehe II.3.2) aufgetrennt. Dieselbe Menge an Ribosomen wie in den Ansätzen und 2,5  $\mu$ g Sec62N-His<sub>6</sub> zusammen mit 5  $\mu$ g BSA wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." bezeichnet.

war (Spur 15). Ab einer KCI-Konzentration von 200 mM war der eEF2 ohne Einfluss zusätzlicher Proteine von den Ribosomen dissoziiert und nicht mehr in der Pellet-Fraktion erkennbar (Spuren 7, 9 und 11). Diese Salzsensitivität zeigt die elektrostatische Natur der Interaktion von eEF2 mit den Ribosomen.

Wurden die Ribosomen mit Sec62N-His<sub>6</sub> inkubiert, so bindet Sec62N-His<sub>6</sub> an die Ribosomen, und diese Bindung wird bei steigender Salzkonzentration schwächer (Spuren 6, 8, 10 und 12). Nicht gebundenes Protein ist demzufolge in dem entsprechenden Überstand zu finden (Spuren 16, 18, 20 und 22). Die höheren Salzkonzentrationen beeinflussen die Bindung des Sec62N-His<sub>6</sub>, was den ionischen Charakter auch für die Sec62N-His<sub>6</sub>-Bindung bestätigt. Ein Effekt des Sec62N-His<sub>6</sub> auf die Bindung des eEF2 am Ribosom kann man nur bei der Salzkonzentration von 150 mM beobachten.

### III.2.1.3 Die His<sub>6</sub>-Markierung des Sec62N hat keinen Einfluss auf die Bindung des Proteins an Ribosomen

In III.2.1.1 wurde gezeigt, dass Sec62N-His<sub>6</sub> an Ribosomen bindet. Um auszuschließen, dass die Interaktion von Sec62N-His<sub>6</sub> mit dem Ribosom unspezifisch über den His<sub>6</sub>-Tag erfolgt, wurde im folgenden Versuch die Bindung an Ribosomen von zwei Konzentrationen an Sec62N-His<sub>6</sub> in Ab- und Anwesenheit von zusätzlichem His<sub>6</sub>-Peptid untersucht. Das His<sub>6</sub>-Peptid diente dazu, mögliche unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Der Verlauf des Ribosomenbindungsversuchs erfolgte wie in II.8 beschrieben. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 28 dargestellt.



# Abb. 28 : Effekt der Zugabe von $His_6$ -Peptid im Bindungsansatz auf die Bindung von Sec62N-His\_6 an Ribosomen

Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe II.8). Die KCI- Konzentration aller Bindungsansätze betrug 100 mM. Die Endkonzentration von Sec62N-His<sub>6</sub> in den Bindungsansätzen betrug 0,27 mM (entsprechend 4  $\mu$ g) oder ca. 0,7  $\mu$ M. Die Endkonzentration von His<sub>6</sub>-Peptid in den Bindungsansätzen betrug 22,5 mM. Die Ansätze wurden für 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) einer SDS-PAGE (siehe II.3.2) unterzogen. 4  $\mu$ g Sec62N-His<sub>6</sub> und dieselbe Menge an Ribosomen wie in den Ansätzen wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." beschriftet.

In Abb. 28 sind Auftrag (Spuren 1-2), Pellets (Spuren 3-8) und Überstände (Spuren 9-14) der Analyse gezeigt.

Die Protein-Kontrolle (Spuren 3 und 9) zeigt, dass Sec62N-His<sub>6</sub> in Abwesenheit von Ribosomen löslich bleibt. Bei der Ribosomen-Kontrolle (Puffer) sieht man, dass der Grossteil der ribosomalen Proteine sowie der eEF2, der bei der verwendeten KCI-Konzentration ribosomenassoziiert blieb, pelletierte (Spur 4).

Im Gegensatz zur Protein-Kontrolle pelletiert Sec62N-His<sub>6</sub>, wenn es in Anwesenheit von Ribosomen inkubiert wurde (Spuren 5-8). Der Bindungsversuch (von zwei unterschiedlichen Sec62N-His<sub>6</sub> Mengen) wurde sowohl in Abwesenheit (Spuren 5-6) als auch in Anwesenheit (Spuren 7-8) von zusätzlichem His<sub>6</sub>-Peptid durchgeführt. In beiden Fällen erfolgte die Bindung des Proteins an die Ribosomen in gleicher Weise.

Wäre die His<sub>6</sub>-Markierung am Bindungsprozess beteiligt gewesen, so hätte diese mit dem His<sub>6</sub>-Peptid (im Überschuss im Bindungsansatz) um die Bindungsstelle(n) am Ribosom kompetiert. Da dies nicht der Fall war, schließt sich daher eine Beteiligung der His<sub>6</sub>-Markierung am Bindungsprozess aus.

#### III.2.1.4 Sec62N-His<sub>6</sub> kofraktioniert bzw. interagiert mit Ribosomen

In den vorherigen Kapiteln wurden Ribosomenbindungsversuche mit Sec62N-His<sub>6</sub> durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass dieses Protein, das in Abwesenheit von Ribosomen löslich im Bindungspuffer blieb, bei der Inkubation mit Ribosomen zusammen mit diesen pelletierte. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Sec62N-His<sub>6</sub> aufgrund einer Aggregation des Proteins allein durch die Anwesenheit der Ribosomen im Bindungsansatz pelletiert, wurden Ribosomen und Sec62N-His<sub>6</sub> in diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugationen eingesetzt. Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden dafür jeweils auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen und zentrifugiert (siehe II.9).

Als erstes wurde das Verhalten der für die Bindungsversuche verwendeten Ribosomen in den Saccharose-Gradienten untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse, in Abb. 29 A wiedergegeben, zeigt, wie sich die Ribosomen nach einer Stunde Zentrifugation im mittleren Bereich des Gradientes verteilen (Spuren 3-9), wobei sie sich auf Höhe der Spur 8 konzentrieren.

Nun wurde Sec62N-His<sub>6</sub> in Ab- (Protein-Kontrolle) und Anwesenheit (Bindungsansatz) von Ribosomen inkubiert und mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Abb. 29 B zeigt das Ergebnis der Protein-Kontrolle. Hier sieht man, dass Sec62N-His<sub>6</sub> in den oberen Fraktionen des Gradienten geblieben ist (Spuren 14-16).

In Anwesenheit von Ribosomen sedimentiert Sec62N-His<sub>6</sub> und verteilt sich mit dem Ribosomen im mittleren Bereich des Gradienten (Spuren 4-9). Darüber hinaus





Es wurden drei Ansätze mit Ribosomen (A = Ribosomen-Kontrolle); Sec62N-His<sub>6</sub> (B = Protein-Kontrolle) und Sec62N-His<sub>6</sub> + Ribosomen (B = Bindungsansatz) vorbereitet. Sie wurden für 15 min bei 30°C inkubiert und jeweils auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und für 1 h zentrifugiert. Pellet und Fraktionen des Gradienten (nach Wessel-Flügge-Fällung (siehe II.3.1)) wurden jeweils mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert. **A**) Ribosomen-Kontrolle: diskontinuierliche Dichte-

gradientenzentrifugation von Ribosomen bei 120 mM KCl und ca. 0,1 mg/ml BSA. 2/5 der Menge an Ribosomen, die im Ansatz eingesetzt wurde, wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). **B)** Protein-Kontrolle: diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation von Sec62N-His<sub>6</sub> (Endkonzentration ca. 0,7  $\mu$ M im Ansatz) in Abwesenheit von Ribosomen bei 120 mM KCl. 2,5  $\mu$ g Sec62N-His<sub>6</sub> und 10  $\mu$ g BSA wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). **C)** Bindungsansatz: diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation von Sec62N-His<sub>6</sub> (Endkonzentration 0,27  $\mu$ M im Ansatz (entsprechend ca. 4  $\mu$ g) in Anwesenheit von Ribosomen bei 100 mM KCl. 2,5  $\mu$ g Sec62N-His<sub>6</sub>, 5  $\mu$ g BSA und 2/5 der Menge an Ribosomen, die im Ansatz eingesetzt wurde, wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag).

ist es dort am höchsten konzentriert, wo die Ribosomen die maximale Dichte zeigen (Spur 8). Das Verhalten von Sec62N-His<sub>6</sub> im Gradienten entspricht also dem der Ribosomen. Die Tatsache, dass ein im Vergleich kleines Moleküle wie Sec62N-His<sub>6</sub> dasselbe Laufverhalten im Gradienten wie die Ribosomen zeigt, kann nur dadurch erklärt werden, dass sie miteinander interagieren und gemeinsam in den Gradienten einlaufen. Nicht gebundenes Protein verbleibt dagegen in den oberen Fraktionen des Gradienten (Spuren 12-13).

Zusammenfassend verhält sich Sec62N-His<sub>6</sub> auch bei einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation wie ein ribosomenassoziiertes Protein.

### III.2.1.5 Die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub>, an Ribosomen ist spezifisch und zum Teil auf das Peptid am N-Terminus zurückzuführen

Um die Eigenschaft von Sec62N-His<sub>6</sub>, an Ribosomen zu binden, genauer zu definieren, wurden zwei Deletionsmutanten des Proteins hergestellt. Synthese und Reinigung der rekombinanten Proteine sind in II.4.4 (siehe Abb. 11) beschrieben. Mit der Deletionsmutante Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub>, einer N-terminal um 10 AA verkürzten Form von Sec62N-His<sub>6</sub> sollte die Bedeutung dieses Bereiches hinsichtlich der Bindung am Ribosom und des Effekts auf die *in vitro*-Translation untersucht werden. Das zweite Fragment, Sec62N98-180-His<sub>6</sub> (Aminosäurereste 98 bis 180 von Sec62p) wurde wegen seiner vorhergesagten physikalischen Eigenschaften ausgesucht. (Analyse mit dem Programm PROTEAN der DNAStar-Software). Durch eine wahrscheinlich  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur, hohe Hydrophilie und "Oberflächen-Wahrscheinlichkeit" stellt dieses ein Fragment von Sec62N dar, das an der Interaktion der gesamten Domäne mit ribosomalen Proteinen oder RNA beteiligt sein könnte. Die Abb. 30 zeigt das Ergebnis der Sequenz-Analyse von Sec62N-His<sub>6</sub>. Der Fragment Sec6298-180 ist darin hervorgehoben.



**Abb. 30 :** Analyse mittels DNA-Star-Software von Sec62N-His<sub>6</sub> α-Helix-Struktur nach Garnier-Robson (1978), Hydrophilie nach Kyte-Doolittle (1982), Oberflächen-Wahrscheinlichkeit nach Emini (1985) berechnet.

Es wurde ein Ribosomenbindungsversuch durchgeführt, in dem die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> im Vergleich zu Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> und Sec62N98-180-His<sub>6</sub> analysiert wurde. Dafür wurden äquimolare Konzentrationen der zwei ersten und eine zwanzigfache Konzentration des letzen eingesetzt. Neben den Bindungsansätzen wurde für jedes Protein eine Protein-Kontrolle durchgeführt, um die Stabilität im Bindungspuffer sicherzustellen. Der Versuch wurde wie in II.8 beschrieben durchgeführt und analysiert (siehe Abb. 31). Der Anteil an ribosomenassoziiertes Protein wurde als Prozent des gesamt eingesetzten Proteins quantifiziert und als Balkendiagramm wiedergegeben. Die Bindungsfähigkeit von Sec62N-His<sub>6</sub> wurde als 100 % gesetzt und damit die der Fragmente berechnet (siehe Abb. 31).

In Abb. 31 sind Auftrag (Spuren 1-4), Pellets (Spuren 5-11) und Überstände (Spuren 12-18) dieser Analyse gezeigt. Bei der Ribosomen-Kontrolle (Puffer) wurden die Ribosomen ohne Zugabe von Protein analysiert. Der Grossteil der ribosomalen Proteine pelletierte (Spur 8). In allen durchgeführten Protein-Kontrollen verbleibt die gesamte Menge der jeweilig eingesetzten Proteine im entsprechenden Überstand, was deren Stabilität im Bindungspuffer beweist.

Wurden Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub> mit Ribosomen inkubiert, so interagieren beide mit den Ribosomen, wobei die Bindungsfähigkeit von



## Abb. 31 : Verhalten von Sec62N-His<sub>6</sub>, Sec62N $\Delta$ N10 und Sec62N98-180 in einem Ribosomenbindungsversuch

Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe II.8). Neben der von Sec62N-His<sub>6</sub> wurde die Bindung von Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub> und Sec62N98-180-His<sub>6</sub> untersucht. Die Endkonzentration im Ansatz der Proteine betrug 0,14 µM für die zwei ersten und 2,8 µM für das letzte. Die KCI-Konzentration aller Bindungsansätze betrug 150 mM. Die Ansätze wurden für 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) einer SDS-PAGE (siehe II.3.2) unterzogen. Dieselbe Menge an Ribosomen wie in den Ansätze und jeweils 1 µg der getesten Proteine wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert. A) Mit Coomassie gefärbtes Gel nach Elektrophorese der Proben. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." beschriftet. B) Quantifizierung des Anteils an Protein, der mit den Ribosomen assoziiert, und der Bindungsfähigkeit der Proteine.

Sec62N∆N10 signifikant schwächer (38 %) ist (vergleichen Spur 10 mit 9 und Abb. 31 B). Wird hingegen Sec62N98-180 betrachtet, so befindet sich das gesamte eingesetzte Protein im Überstand (Spur 18).

Zusammenfassend sind die ersten 10 Aminosäurereste, die das hochgeladene Peptid einschließen, wesentlich für die Interaktion der N-terminalen Domäne von Sec62p mit den Ribosomen, wobei weitere Merkmale dieser Domäne auch an der Interaktion beteiligt sind.

# III.2.1.6 GST-Sec62C bindet nicht am Ribosom und beeinflusst die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> am Ribosom nicht

In Hefe wurde gezeigt, dass die C-terminale cytosolische Region von Sec62p eine putative Effektordomäne und eine für die Interaktion mit dem Sec-Komplex wichtige Domäne enthält (siehe Abb. 1). Vergleichsanalysen der Primärstruktur von Sec62p in Hefe und Mensch zeigen eine hohe Homologie zwischen den Proteinen (Daimon *et al.*, 1997) und das *Drosophila*-Homolog kann Sec62p in Hefe funktionell ersetzen (Noel und Cartwright, 1994). Dieses deutet darauf hin, dass die C-terminale cytosolische Region von Sec62p im Säuger ebenfalls eine Rolle bei der Funktion dieses Proteins spielen könnte.

Die Sequenzanalyse dieser Region mit dem Programm PROTEAN (DNAStar-Software) zeigt im Gegensatz zur N-terminalen Domäne kein basisches Oligopeptid, das Ahnlichkeit mit dem von Mtj1p oder SRP14 hat. Um zu untersuchen, ob dennoch auch hier eine Interaktion mit dem Ribosom stattfinden kann, wurde diese Region des Sec62p als Fusionsprotein mit GST (GST-Sec62C) synthetisiert (siehe Abb. 9II.4.2 und II.4.5). GST-Sec62C wurde in einem Ribosomenbindungsversuch eingesetzt, zusätzlich wurde hier auch eine mögliche Kompetition mit der N-terminalen cytosolischen Domäne (Sec62N-His<sub>6</sub>) untersucht. Eine Ribosomen-Kontrolle sowie die entsprechende Protein-Kontrolle wurden ebenfalls parallel durchgeführt (siehe II.8). Die letztere diente zur Kontrolle der Stabilität des Proteins in der Reaktionslösung, um eine falsch positive Aussage über die Bindung an Ribosomen auszuschließen. Nach der Inkubation, während der die Bindung an die Ribosomen stattfinden sollte, wurden die Proben auf ein Saccharose-Kissen geschichtet, zentrifugiert, und Pellet und Überstand getrennt, weiter verarbeitet und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels sichtbar gemacht (siehe Abb. 32).

In Abb. 32 sind Auftrag (Spuren 1-2), Pellets (Spuren 3-11) und Überstände (Spuren 12-20) gezeigt. Bei der Ribosomen-Kontrolle (Puffer) wurden die Ribosomen ohne Zugabe von Protein analysiert. Der Grossteil der ribosomalen Proteine pelletierte und ist der Pellet-Fraktion erkennbar (Spur 6).

In der Pellet-Fraktion des Bindungsansatzes, in dem Sec62N-His<sub>6</sub> allein eingesetzt wurde, erkennt man die Interaktion dieses Poteins mit den Ribosomen (Spur 7). Ein zweiter Bindungsansatz für Sec62N-His<sub>6</sub> wurde in Anwesenheit von GST



# Abb. 32 : Verhalten von GST-Sec62C und Kompetition mit Sec62N-His $_6$ in einem Ribosomenbindungsversuch

Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe II.8). Die Endkonzentration im Ansatz an Sec62N-His<sub>6</sub>, GST-Sec62C und GST betrug 0,14  $\mu$ M. Die Endkonzentration im Ansatz an His<sub>6</sub>-Peptid betrug 22,5 mM. Die KCI-Konzentration aller Bindungsansätze betrug 110 mM. Die Ansätze wurden für 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) einer SDS-PAGE unterzogen. Dieselbe Menge an Ribosomen wie in den Ansätze (3,5  $\mu$ I) und jeweils 1  $\mu$ g der Proteine wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." beschriftet. Ein o, • bzw. \* hilft die Höhe von GST-Sec62C, Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. GST der Breite des Polyacrylamidgels entlang nachzuvollziehen.

und zusätzlichem His<sub>6</sub>-Peptid durchgeführt. Dies diente der Untersuchung eines möglichen Einflusses dieses Proteins bzw. Peptids, die die Markierung von Sec62C darstellen (siehe II.1.8), auf die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub>. Das Proteinbandenmuster der Pellet-Fraktion dieses Ansatzes (Spur 8) zeigte keine Abweichung im Vergleich zum Ansatz, in dem Sec62N-His<sub>6</sub> allein eingesetzt wurde (Spur 7). So zeigte sich, dass die Markierung von GST-Sec62C keinen Einfluss auf der Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> hat. Die Protein-Kontrolle für Sec62N-His<sub>6</sub> wurde in Anwesenheit von GST und zusätzlichem His<sub>6</sub>-Peptid durchgeführt und bestätigte wieder die vollständige Stabilität dieses Proteins in der Reaktionslösung (Spuren 3 und 12).

Wurden Ribosomen mit GST-Sec62C inkubiert, so erscheint in der Pellet-Fraktion (Spur 9 und 10) eine neue Bande (im Vergleich zur Ribosomen-Kontrolle) auf der Höhe dieses Proteins (siehe Auftrag). Trotzdem verbleibt der Grossteil des eingesetzten Proteins in der Überstand-Fraktion (Spur 18 und 19). Die ProteinKontrolle für GST-Sec62C wurde unter denselben Bedingungen wie bei Sec62N-His<sub>6</sub> durchgeführt. Sie zeigt, dass GST-Sec62C zum Teil aggregiert und daher in Abwesenheit von Ribosomen pelletiert (Spur 4). Die Proteinmenge, die in Ab- und Anwesenheit von Ribosomen pelletiert, ist dieselbe, und daher kann gefolgert werden, dass es sich bei GST-Sec62C um keine Bindung an Ribosomen, sondern um Aggregation handelt.

Bei dem Ansatz, in dem die Kompetition zwischen Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-Sec62C untersucht wurde, zeigt die Pellet-Fraktion (Spur 11) eine ähnliche Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> wie wenn es ohne GST-Sec62C eingesetzt wurde. Da GST-Sec62C mit den Ribosomen nicht interagiert, kann auch nicht mit Sec62N-His<sub>6</sub> um die Bindungsstelle am Ribosom kompetieren. Nicht gebundenes Sec62N-His<sub>6</sub> ist in der Überstand-Fraktion in einer dichteren Bande zu erkennen, als wenn es allein eingesetzt wurde (Spur 20 verglichen mit 16 und 17). Man muss beachten, dass die Spur 20 insgesamt dichter ist als die anderen erwähnten Spuren. Die höhere Proteindichte in den Ansätzen, in denen GST-Sec62C eingesetzt wurde, scheint die Effizienz der TCA-Fällung zu verbessern (Spuren 13, 14, 18, 19 und 20), doch es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des eingesetzten Sec62N-His<sub>6</sub> mit GST-Sec62C interagiert und dadurch nicht mehr mit Ribosomen interagieren kann. Diese Möglichkeit wird im nächsten Abschnitt untersucht.

# III.2.1.7 N- und C-terminale Domänen von Sec62p interagieren nicht miteinander

Im vorherigen Abschnitt ergab sich die Möglichkeit, dass Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-Sec62C in einem Ribosomenbindungsversuch miteinander interagieren könnten. Um dies zu bestätigen, wurde ein "pulldown"-Versuch mit beiden Proteinen durchgeführt (siehe II.3.11). Dafür wurden drei Ansätze vorbereitet, wo beide Proteine zusammen oder einzeln zugegeben wurden. Die Ansätze wurde so ausgewählt, dass dieselben Pufferbedingungen wie in einem Ribosomenbindungsversuch herrschten. Nach der Inkubation, während der die Interaktion stattfinden sollte, erfolgte eine Inkubation mit dem Säulenmaterial. Pellets mit dem gebundenen Protein und Überstände mit dem ungebundenen Protein wurden getrennt und einer SDS-PAGE unterzogen. Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung detektiert (siehe Abb. 33).



**Abb. 33 : "pulldown"-Versuch von Sec62N-His**<sub>6</sub> und GST-Sec62C mittels GSH-Sepharose Es wurden drei Reaktionsansätze vorbereitet die sich im Gehalt an Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-Sec62C unterschieden (Endkonzentration der rekombinant hergestellten Proteine in den entsprechenden Ansätze 0,1  $\mu$ M). Die KCI-Endkonzentration in jedem Ansatz betrug 110 mM. Die Ansätze wurden für 30 min inkubiert und anschließend zu dem zuvor vorbereiteten Säulenmaterial zugegeben (siehe II.3.11). Es schließt sich eine Inkubation für 1 h bei 4°C unter Rollen mit anschließender Zentrifugation an. Gewaschene Pellets ("Gebunden") und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1); "Ungebunden") wurden einer SDS-PAGE (siehe II.3.2) unterzogen. Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert.

In Abb. 33 sind die Fraktionen "Gebunden" und "Ungebunden" gezeigt. Das Säulenmaterial bindet fast vollständig das GST-Sec62C, wenn es allein oder zusammen mit Sec62N-His<sub>6</sub> eingesetzt wurde (Spuren 3 und 1), was die native Konformation der GST-Markierung bestätigt. Sec62N-His<sub>6</sub> zeigte keine unspezifische Bindung an die GSH-Sepharose (Spur 2 und 5). Wurden beide Proteine zusammen eingesetzt, so war der größte Teil des GST-Sec62C an das Säulenmaterial gebunden. Auf der Höhe des Sec62N-His<sub>6</sub> ist eine Bande in der "Gebunden"-Fraktion zu sehen (Spur 1), die aber auch im Ansatz ohne Sec62N-His<sub>6</sub> im gleichen Maßen vorkommt (Spur 3). Hierbei muss es sich um eine Verunreinigung oder Abbauprodukt in der GST-Sec62C-Lösung handeln. Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass die N- und C-terminale Domäne von Sec62p unter den gewählten Bedingungen nicht miteinander interagieren.

### III.2.2 Kompetitionsversuche von Sec62N-His<sub>6</sub>, Mtj1p-C∆C und GST-SRP14 um ihre Bindungstellen am Ribosom

In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass Sec62N-His<sub>6</sub> unter den verwendeten Bedingungen an Ribosomen bindet. Wesentlich für diese Interaktion ist, wie bei Mtj1p und SRP14 (Dudek, 2002; Dudek *et al.*, 2002), ein hoch geladenes Oligopeptid (siehe III.2).

Unter Betrachtung der Ähnlichkeit der Oligopeptide in allen drei Proteinen, wurde nun untersucht, ob sie um eine Bindungsstelle am Ribosom konkurrieren, dafür wurde ihre Bindung, paarweise, in Ribosomenbindungsversuchen analysiert (Sec62p vs. Mtj1p; Sec62p vs. SRP14 und Mtj1p vs. SRP14). Eine mögliche Kompetition der jeweils zwei getesteten Proteine um ihre Bindungsstelle am Ribosom wurde untersucht, indem sie gemeinsam zu jeweils zwei Bindungsansätzen gegeben wurden. In jedem Ansatz war alternativ einer der Proteine in dreifachen Überschuss zum anderen eingesetzt. (siehe II.8). Um weitere Informationen über die Bindungsstelle und Reversibilität der Bindung der getesten Proteine am Ribosom zu gewinnen, wurde auch untersucht, ob eines der Proteine das andere, vorher gebundene, von seiner Bindungsstelle am Ribosom verdrängt. Hierzu wurden zwei weitere Bindungsansätzen vorbereitet (siehe II.8), bei denen jeweils die einfache Menge des ersten Proteins mit Ribosomen inkubiert und anschließend mit der etwa dreifachen Menge des zweiten Proteins weiter inkubiert wurde. Nach der Zentrifugation auf einem Saccharose-Kissen wurden Pellets und Überstände mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine per Coomassie-Färbung detektiert (siehe III.2.2.1, III.2.2.2 und III.2.2.3.)

#### III.2.2.1 Sec62N-His<sub>6</sub> kompetiert mit Mtj1p-C∆C um die Bindung am Ribosom

Wie oben beschrieben, wurde hier untersucht ob die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p (Sec62N-His<sub>6</sub>) und die C-terminale cytosolische Domäne von Mtj1p (Mtj1p-C $\Delta$ C) um ihre Bindungsstelle am Ribosom kompetieren. Abb. 34 A zeigt Auftrag (Spuren 1-2), Pellets (Spuren 3-10) und Überstände (Spuren 11-18) dieser Analyse.

Die Protein-Kontrolle zeigte, dass beide Proteine, mit Ausnahme eines minimalen Anteils von Mtj1p-C $\Delta$ C, im Bindungspuffer löslich bleiben, und daher im Überstand zu sehen waren (Spuren 3 und 11). Sie wurden zusammen eingesetzt, um zu testen, ob allein deren Anwesenheit im Bindungspuffer einen gegenseitigen Einfluss auf ihre Solubilität haben könnte. Die Ribosomen-Kontrolle (Spuren 4 und 12) zeigt das Bandenmuster der pelletierten ribosomalen Proteine in Abwesenheit jeglicher zusätzlicher Proteine.

Bei den zwei Ansätzen, in denen jeweils die einfache Menge (1x) an Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. Mtj1p-C $\Delta$ C zugegeben wurde (Bind.), erkennt man in der Pellet-Fraktion, dass beide Proteine an Ribosomen binden (Spuren 5 bzw. 6). Nicht gebundenes Protein ist in der Überstand-Fraktion zu sehen (Spuren 13-14). Die Proteinmenge, die an die Ribosomen gebunden war, wurde mit Hilfe der Image-Quant-Software densitometrisch quantifiziert und als 100 % gesetzt (siehe Abb. 34 B).

Wurden beide Proteine gleichzeitig für die Kompetitionsanalyse zum Ansatz gegeben (Komp.), so sind beide in den Pellet-Fraktionen zu erkennen (Spuren 7-8). Für beide Proteine ist zu beobachten, dass die Bindung des im Überschuss eingesetzten Proteins (3x) zu einer deutlich verminderten Bindung des einfach eingesetzten (1x) führte (Vergleich der Spur 7 mit 6 und 8 mit 5). Dies zeigt, dass die Proteine nicht gleichzeitig an Ribosomen binden können. Die Quantifizierung der verminderten Bindung des einfach eingesetzten Proteins an die Ribosomen in Anwesenheit des möglichen Kompetitors wurde in Prozent der maximalen Bindung (Bind.) berechnet (siehe Abb. 34 B). Das Ergebnis der Quantifizierung zeigt, dass Sec62N-His<sub>6</sub> effektiver von Mtj1p-C $\Delta$ C kompetiert wird als Mtj1p-C $\Delta$ C von Sec62N-His<sub>6</sub>. Das bedeutet, dass Mtj1p-C $\Delta$ C eine größere Affinität für die Bindungstelle als Sec62N-His<sub>6</sub> hat.

Die Pellet-Fraktionen der Verdrängungsversuche (Verdr.) geben dasselbe Proteinbandenmuster wie die entsprechenden Kompetitionsversuche wieder (Spur 9 ähnlich als 8 und 10 als 7). Dieses kann dadurch erklärt werden, dass ein Teil des erst gebundenen Proteins (siehe Spuren 5 bzw. 6) durch die Zugabe eines Überschusses des zweiten Proteins, von seiner Bindungsstelle am Ribosom verdrängt wird. Diese Verdrängung von jeweils einem Protein durch das andere zeigt, dass ihre Bindung in beiden Fällen reversibel ist. Dies zeigt, dass es sich um die Kompetition um die Bindungstelle am Ribosom handelt. Die Quantifizierung der nun an den Ribosomen gebundenen Proteinmenge (siehe Abb. 34 B) zeigt für Mtj1p-C $\Delta$ C, dass, obwohl es sich von der dreifachen Menge Sec62N-His<sub>6</sub> verdrängen ließ, der erreichte Wert nicht dem der Kompetition entsprach. Im Fall von Sec62N-His<sub>6</sub> ähnelte der Wert im Verdrängungsversuch dem der Kompetition.

Zusammenfassend spricht das Ergebnis dieser Analyse dafür, dass Sec62N-His<sub>6</sub> und Mtj1p-C $\Delta$ C dieselbe oder überlappende Bindungsstelle(n) am Ribosom haben, wobei die Bindung der Proteine reversibel ist.



# Abb. 34 : Kompetition und Verdrängung zwischen Sec62N-His $_6$ und Mtj1p-C $\Delta$ C bei ihrer Bindung am Ribosom

Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe II.8). Die KCI-Konzentration aller Bindungsansätze betrug 150 mM. Die Endkonzentration von Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. von Mtj1p-C∆C in den Bindungsansätzen betrug 0,14 µM (1x) oder 0,47 µM (3x). Die Ansätze ohne Ribosomen und die Ansätze, in denen die Bindung der Proteine untersucht wurde (Bind.), wurden für 15 min inkubiert. Bei den Ansätzen, in denen die Kompetition (Komp.) der zwei Proteine untersucht wurde, wurden diese gleichzeitig zugegeben und für 15 min inkubiert. Bei den Ansätzen, in denen die Verdrängung (Verdr.) eines Proteins durch die Zugabe des zweiten untersucht wurde, wurde das erste Protein zugegeben (1x), dann 15 min inkubiert und anschließend das zweite Protein in einer etwa dreifachen Konzentration zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) mittels SDS-PAGE (siehe II.3.2) aufgetrennt. Dieselbe Menge an Ribosomen wie in den Ansätzen und 1 µg Sec62N-His<sub>6</sub> (+) zusammen mit 1  $\mu$ g Mtj1p-C $\Delta$ C (+), wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) analysiert. A) Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." bezeichnet. B) Die Menge an Protein, die an die Ribosomen bindet, wurde densitometrisch mit Hilfe der Image-Quant-Software quantifiziert. Die maximale Bindung der jeweiligen Proteine, wenn sie allein inkubiert wurden (Bind.), wurde als 100 % gesetzt. Die Bindung an die Ribosomen in Anwesenheit eines Kompetitors bei den Kompetitions- und Verdrängungs-Versuchen wurde als Prozent in Bezug auf die entsprechende maximale Bindung berechnet und in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben.

### III.2.2.2 Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-SRP14 kompetieren nicht um ihrer Bindungsstelle am Ribosom

Wie in III.2.2 beschrieben, wurde hier untersucht ob die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p (als Sec62N-His<sub>6</sub>) und SRP14 (als GST-SRP14) um ihre Bindungsstelle am Ribosom kompetieren. Abb. 35 A zeigt Auftrag (Spuren 1-2), Pellets (Spuren 3-10) und Überstände (Spuren 11-18) dieser Analyse.

Die Protein-Kontrolle zeigte, dass beide Proteine, mit Ausnahme eines minimalen Anteils von GST-SRP14, im Bindungspuffer löslich bleiben. Zusammen eingesetzt haben sie keinen gegenseitigen Einfluss auf ihre Solubilität (Spuren 3 und 11). Die Ribosomen-Kontrolle (Spuren 4 und 12) zeigt das Bandenmuster der pelletierten ribosomalen Proteine in Abwesenheit jeglicher zusätzlicher Proteine.

Bei den zwei Ansätzen, in denen jeweils die einfache Menge (1x) an Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. GST-SRP14 zugegeben wurde (Bind.), erkennt man in der Pellet- Fraktion, dass beide Proteine an Ribosomen binden (Spuren 5 bzw. 6). Nicht gebundenes Protein ist in der Überstand-Fraktion zu sehen (Spuren 13-14). Die Proteinmenge, die an die Ribosomen gebunden hat, wurde densitometrisch quantifiziert und 100 % gesetzt. (siehe Abb. 35 B).

Wurden beide Proteine gleichzeitig für die Kompetitionsanalyse zum Ansatz gegeben (Komp.), so sind beide in den Pellet-Fraktionen zu sehen (Spuren 7-8). Für beide Proteine ist zu beobachten, dass die Bindung des im Überschuss eingesetzten Proteins (3x) kaum Einfluss auf die Bindung des einfach eingesetzten (1x) hatte (Vergleich der Spur 7 mit 6 und 8 mit 5). Die Quantifizierung der Proteinmenge des einfach eingesetzten Proteins (1x) in Anwesenheit des möglichen Kompetitors, die an die Ribosomen band, wurde in Prozent der maximalen Bindung (Bind.) berechnet (siehe Abb. 35 B). Das Ergebnis zeigt, dass trotz der Anwesenheit der dreifachen Menge und entsprechend stärkere Bindung von GST-SRP14 bzw. Sec62N-His<sub>6</sub> der Grossteil des Sec62N-His<sub>6</sub> (87 %) bzw. des GST-SRP14 (83 %) an die Ribosomen gebunden bleibt, was eine Kompetition beider Proteine um eine Bindungsstelle ausschließt.

In den Verdrängungsversuchen (Verdr.) zeigen die Pellet-Fraktionen dasselbe Proteinbandenmuster wie die entsprechenden Kompetitionsversuche (Spur 9 ähnlich als 8 und 10 als 7). Die Quantifizierung der nun an die Ribosomen gebundenen Proteinmenge (siehe Abb. 35 B) zeigt ähnliche Werte für beide Proteine wie in den jeweiligen Kompetitionsversuchen. Es ist selbstverständlich, dass, wenn



## Abb. 35 : Kompetition und Verdrängung zwischen Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-SRP14 um ihre Bindung am Ribosom

Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe II.8). Die KCI-Konzentration aller Bindungsansätze betrug 150 mM. Die Endkonzentration von Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. GST-SRP14 in den Bindungsansätzen betrug 0,14 µM (1x) oder 0,47 µM (3x). Die Ansätze ohne Ribosomen und die Ansätze, in denen die Bindung der Proteine untersucht wurde, wurden für 15 min inkubiert. Bei den Ansätzen, in denen die Kompetition (Komp.) der zwei Proteine untersucht wurde, wurden diese gleichzeitig zugegeben und für 15 min inkubiert. Bei den Ansätzen, in denen die Verdrängung (Verdr.) eines Proteins durch die Zugabe des zweiten untersucht wurde, wurde das erste Protein zugegeben (1x), dann 15 min inkubiert und anschließend das zweite Protein in einer etwa dreifachen Konzentration zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) mittels SDS-PAGE (siehe II.3.2) aufgetrennt. Dieselbe Menge Ribosomen wie in den Ansätzen und 1 µg Sec62N-His<sub>6</sub> (+) zusammen mit 1 µg GST-SRP14 (+) wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) detektiert. A) Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." bezeichnet. Ein • hilft die Höhe des Sec62N-His<sub>6</sub> der Breite des Polyacrylamidgels entlang nachzuvollziehen. B) Die Menge an Protein, die an die Ribosomen bindet, wurde densitometrisch mit Hilfe der Image-Quant-Software guantifiziert. Die maximale Bindung der jeweiligen Proteine, wenn sie allein inkubiert wurden (Bind.), wurde als 100 % gesetzt. Die Bindung an die Ribosomen in Anwesenheit eines Kompetitors bei den Kompetitions- und Verdrängungs-Versuche wurde als Prozent in Bezug auf die entsprechende maximale Bindung berechnet und in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben.

beide Proteine um die Bindungsstelle am Ribosom nicht konkurrieren, sie auch nicht in der Lage sind, einander zu verdrängen.

Zusammenfassend spricht das Ergebnis dieser Analyse dafür, dass Sec62N-His<sub>6</sub> und GST-SP14 unterschiedliche Bindungsstellen am Ribosom haben.

### III.2.2.3 GST-SRP14 kompetiert zum Teil um die Bindungsstelle von Mtj1p-C∆C am Ribosom

Wie in III.2.2 beschrieben, wurde hier untersucht ob die C-terminale cytosolische Domäne von Mtj1p (Mtj1p-C $\Delta$ C) und SRP14 (GST-SRP14) um ihre Bindungsstelle am Ribosom kompetieren. Abb. 36 A zeigt Auftrag (Spuren 1-2), Pellets (Spuren 3-10) und Überstände (Spuren 11-18) dieser Analyse.

Die Protein-Kontrolle zeigt, dass beide rekombinant hergestellte Proteine mit Ausnahme eines minimalen Anteils im Bindungspuffer löslich bleiben. Zusammen eingesetzt haben keinen gegenseitigen Einfluss auf deren Solubilität (Spuren 3 und 11). Die Ribosomen-Kontrolle, Ribosomen ohne zusätzlicher Proteine, (Spuren 4 und 12) zeigt das Bandenmuster der pelletierten ribosomalen Proteine.

Bei den zwei Ansätzen in denen die einfache Menge (1x) an Mtj1p-C $\Delta$ C bzw. GST-SRP14 zugegeben wurde (Bind.), erkennt man in der Pellet-Fraktion, dass beide Proteine an Ribosomen binden (Spuren 6 bzw. 5). Nicht gebundenes Protein ist in der Überstand-Fraktion zu sehen (Spuren 14 bzw. 13). Die Proteinmenge, die an die Ribosomen gebunden hat, wurde densitometrisch quantifiziert und 100 % gesetzt. (siehe Abb. 36 B).

Der Effekt, den Mtj1p-C $\Delta$ C auf die Bindung von GST-SRP14 hat, wurde in einem Kompetitions- (Spuren 8 und 16) und einem Verdrängungsversuch (Spuren 9 und 17) getestet, dabei wurde Mtj1p-C $\Delta$ C dreifach (3x) konzentriert gegenüber von GST-SRP14 eingesetzt. Kompetitions- und Verdrängunsversuche zeigen dasselbe Proteinbandenmuster, dabei sind beide Proteine in den Pellet-Fraktionen zu erkennen. Die Bindung des in dreifachem Überschuss eingesetzten Mtj1p-C $\Delta$ C, hat kaum Einfluss auf die Bindung von GST-SRP14 (Spur 8 und 9 im Vergleich zu 5). Das Ergebnis zeigt, dass trotz der Anwesenheit der dreifachen Menge von Mtj1p-C $\Delta$ C der Grossteil des GST-SRP14 (91 % (Komp.) bzw. 92 % (Verdr.)) an



#### Abb. 36 : Kompetition und Verdrängung zwischen Mtj1p-C∆C und GST-SRP14 um ihre Bindung am Ribosom

Die Ansätze eines Ribosomenbindungsversuchs wurden vorbereitet (siehe II.8). Die KCI-Konzentration aller Bindungsansätze betrug 150 mM. Die Endkonzentration von GST-SRP14 bzw. Mtj1p-C∆C in den Bindungsansätzen betrug 0,14  $\mu$ M (1x) oder 0,47  $\mu$ M (3x). Die Ansätze ohne Ribosomen und die Ansätze, in denen die Bindung der Proteine untersucht wurde, wurden für 15 min inkubiert. Bei den Ansätzen, in denen die Kompetition (Komp.) der zwei Proteine untersucht wurde, wurden diese gleichzeitig zugegeben und für 15 min inkubiert. Bei den Ansätzen in den die Verdrängung (Verdr.) eines Proteins durch die Zugabe des zweiten untersucht wurde, wurde das erste Protein zugegeben (1x), dann 15 min inkubiert und anschließend das zweite Protein in einer etwa dreifachen Konzentration zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden Pellets und Überstände (nach TCA-Fällung (siehe II.3.1)) mittels SDS-PAGE (siehe II.3.2) aufgetrennt. Dieselbe Menge Ribosomen wie in den Ansätze und 1 µg GST-SRP14 (+) zusammen mit 1 µg Mtj1p-C∆C (+), wurden auf das Gel aufgetragen (Auftrag). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels Coomassie-Färbung (siehe II.3.4) detektiert. A) Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Die Ansätze ohne Ribosomen wurden als "-Rib.", die mit Ribosomen als "+Rib." bezeichnet. B) Die Menge an Protein, die an die Ribosomen bindet, wurde densitometrisch mit Hilfe der Image-Quant-Software quantifiziert. Die maximale Bindung des jeweiligen Proteins, wenn es allein inkubiert wurde (Bind.), wurde als 100 % gesetzt. Die Bindung an die Ribosomen in Anwesenheit eines Kompetitors bei den Kompetitions- und Verdrängungs-Versuche wurde als Prozent in Bezug auf die entsprechende maximale Bindung berechnet und im Form eines Balkendiagramms wiedergegeben.

die Ribosomen gebunden bleibt. Dieses Ergebnis schließt daher eine Kompetition von Mtj1p-C∆C gegenüber GST-SRP14 um die Bindungstelle am Ribosom aus, was dafür spricht, dass sie unterschiedliche Bindungsstellen am Ribosom haben.

Der Effekt, den GST-SRP14 auf die Bindung von Mtj1p-C $\Delta$ C hat, wurde ebenfalls in einem Kompetitions- (Spuren 7 und 15) und einem Verdrängungsversuch (Spuren 10 und 18) getestet, wobei GST-SRP14 dreifach (3x) konzentriert gegenüber von Mtj1p-C $\Delta$ C eingesetzt wurde. Wieder zeigen Kompetitions- und Verdrängungsversuche dasselbe Proteinbandenmuster. In diesem Fall wird beobachtet, dass beim Einsatz des dreifach konzentrierten GST-SRP14 die Menge an Mtj1p-C $\Delta$ C das an die Ribosomen bindet, etwas niedriger wird (Spuren 7 und 10 gegenüber 6). Die Quantifizierung der Menge an Mtj1p-C $\Delta$ C, die an die Ribosomen band, wurde als Prozent in Bezug auf dessen maximale Bindung (Bind.) berechnet (siehe Abb. 36 B links) und zeigt eine Reduktion der Bindung auf 70 % (Komp.) bzw. 73 % (Verdr.). Eine Kompetition bzw. Verdrängung von etwa 30 % der Mtj1p-C $\Delta$ C bedeutet, dass bei einem Überschuss an SRP14, es in der Lage ist, zum Teil an der Bindungsstelle von Mtj1p-C $\Delta$ C zu binden.

Zusammenfassend spricht das Ergebnis dieser Analyse dafür, dass Mtj1p-C $\Delta$ C und GST-SP14 unterschiedliche Bindungsstellen am Ribosom haben, wobei SRP14 (bei den verwendeten Konzentrationen) offenbar auch an der Bindungsstelle von Mtj1p-C $\Delta$ C binden kann.

### III.2.3 Sec62N-His<sub>6</sub>, Sec62N∆N10, Sec62N98-180 und GST-Sec62C in *in vitro*-Translationsversuchen

Nach dem in den vorausgegangenen Versuchen gezeigt wurde, dass die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p ebenso wie Mtj1p mit Ribosomen interagieren kann und mit diesem um die Bindungsstelle(n) am Ribosom konkurriert, wurde nun die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion untersucht. Da für Mtj1p bekannt ist, dass es durch seine Bindung am Ribosomen die Translation von Proteinen in Retikulozytenlysat hemmen kann (Dudek, 2002; Dudek *et al.*, 2002), wurde für verschiedene Fragmente des Sec62p untersucht, ob ein ähnlicher Effekt auftritt. Eingesetzt wurde die N-terminale Domäne von Sec62p (als Sec62N-His<sub>6</sub>), welche für die Bindung von Sec62p an Ribosomen ausreichend ist, sowie ihre verkürzten Formen Sec62N∆N10 und Sec62N98-180, die eine verminderte Bindung bzw. keine
Bindung zeigten (siehe III.2.1.5). Die C-terminale cytosolische Region von Sec62p (als GST-Sec62C), welche nicht in der Lage ist mit Ribosomen zu interagieren (siehe III.2.1.6), wurde auch getestet.

# III.2.3.1 Sec62N-His<sub>6</sub> inhibiert die *in vitro*-Synthese von Präprolaktin in Kaninchen-Retikulozytenlysat

Als erstes wurde der Einfluss von Sec62N-His<sub>6</sub> auf die Synthese von sekretorischen Proteinen analysiert. Als Modell für ein sekretorisches Protein diente Präprolaktin (ppL), welches in früheren Untersuchungen über die Regulation der Translation schon verwendet wurde (Walter und Blobel, 1981b; Wolin und Walter, 1989; Dudek *et al.*, 2002) (siehe II.1.8). Die *in vitro*-Synthese unter radioaktiver Markierung erfolgte im Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von Puffer oder drei verschiedenen Konzentrationen an Sec62N-His<sub>6</sub>. Die Konzentration aktiver Ribosomen in der eingesetzten Menge an Kaninchen-Retikuloytenlysat (20%) beträgt ca. 0,15 µM. Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert und Proben wurden nach 10, 20, 30 und 40 Minuten entnommen. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Visualisierung radioaktiv markierten Präprolaktins durch Phosphorimaging. Dies ist in Abb. 37 A dargestellt.

Die synthetisierte Proteinmenge wurde densitometrisch quantifiziert. Die graphische Darstellung der Quantifizierung ist in Abb. 37 B wiedergegeben. Die finale Menge des in Gegenwart von Puffer synthetisierten Präprolaktins wurde 100 % gesetzt. Die Synthese von ppL in Anwesenheit steigender Sec62N-His<sub>6</sub>-Konzentrationen wurde auf die Puffer-Kontrolle bezogen. Die Synthese von ppL wurde bei steigenden Mengen an Sec62N-His<sub>6</sub> stark reduziert. Eine fast vollständige Hemmung der Translation wurde bei 1 µM Protein im Translationsansatz erreicht, d. h. bei einem Verhältnis von Ribosomen zu Sec62N-His<sub>6</sub> von 1 : 6,6. In gleicher Weise durchgeführte Ansätze, in denen Sec62N-His<sub>6</sub>, das unter verschiedenen Salz- und Detergenz-Bedingungen gehalten wurde (siehe Abb. 10), eingesetzt wurde, wurden ähnliche Ergebnisse erreicht (Daten nicht gezeigt).



Abb. 37 : Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> auf die *in vitro*-Synthese von Präprolaktin (ppL)

Ein Translationsansatz für die in vitro-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde angesetzt (siehe II.6.2.1). Er wurde in vier Aliquots aufgeteilt. Jedem Aliquot wurde MV-Puffer (siehe II.7.1) oder Sec62N-His<sub>6</sub> (in MV-Puffer) zugegeben, so dass die Endkonzentration an Sec62N-His<sub>6</sub> 0,2, 0,4 und 1,0  $\mu$ M betrug. Die Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 10, 20, 30 und 40 Minuten Proben entnommen wurden, die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. **A)** Phosphorimaginganalyse der Proben bei Zugabe von Sec62N-His<sub>6</sub> in Stammlösung mit KCI 50 mM ohne CHAPS. **B)** Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese. Die Puffer-Kontrolle nach 40 Minuten Inkubation wurde jedes Mal als 100 % der Synthese gesetzt. Die Synthese von ppL in Anwesenheit steigender Sec62N-His<sub>6</sub>-Konzentrationen wurde auf die Puffer-Kontrolle bezogen.

Ob die Reduktion der Menge an synthetisiertem ppL in der Gegenwart von Sec62N-His<sub>6</sub> auf Proteolyse zurückzuführen ist, wurde in dem folgenden Experiment getestet. Sec62N-His<sub>6</sub> wurde zu zwei Ansätzen für die *in vitro* Synthese von radioaktiv markiertem ppL zugegeben, wobei einer der Ansätze bei 30°C für 40 min vorinkubiert wurde, dann wurden die Ansätze bei 30°C inkubiert und während dessen Proben entnommen. Ein dritter Ansatz wurde als Kontrolle mit Puffer behandelt. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Visualisierung radioaktiv markierten Präprolaktins durch Phosphorimaging. Das Ergebnis der nachfolgenden Quantifizierung ist in Abb. 38 dargestellt. Dabei wurde die Menge des final synthetisierten Proteins im Ansatz mit Puffer als 100% gesetzt.



Abb. 38 : Die Reduktion der Proteinmenge durch Sec62N-His<sub>6</sub> erfolgt nicht durch proteolytischen Abbau

Ein Translationsansatz für die in vitro-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde angesetzt (siehe II.6.2.1). Er wurde in drei Aliquots aufgeteilt. Den Aliquots wurde die selbe Volumen an (a) MV-Puffer (siehe II.7.1), (b) Sec62N-His<sub>6</sub> in MV-Puffer (Endkonzentration 1  $\mu$ M) oder (c) H<sub>2</sub>O zugegeben. Die ersten zwei Translationsansätze (a und b) wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 10, 20 und 40 Minuten Proben entnommen wurden. Der dritte Ansatz (c) wurde für 40 min vorinkubiert, dann wurde Sec62N-His<sub>6</sub> (Endkonzentration 1 mM) dazu gegeben, eine Probe entnommen, und der Ansatz weitere 40 min inkubiert, nach denen eine zweite Probe entnommen wurde. Es folgte die Auftrennung der Proteine in den Proben durch SDS-PAGE. Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Phosphorimaging sichtbar gemacht, quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Menge des in Gegenwart von Puffer synthetisierten Proteins wurde als 100% gesetzt.

Die Zugabe von Sec62N-His<sub>6</sub> am Anfang der Reaktion führte zu einer vollständigen Reduktion der synthetisierten Proteinmenge im Vergleich zu dem Ansatz mit Puffer. Wurde Sec62N-His<sub>6</sub> nach einer 40-minütigen Vorinkubation zugegeben und für weitere 40 Minuten inkubiert, so war die Gesamtmenge an synthetisiertem ppL konstant geblieben. Es war keine weitere Synthese nachzuweisen. Die etwas höhere Synthese nach der Vorinkubation, im Vergleich zum Ansatz mit Puffer, ist auf eine niedrigere Salzkonzentration im vorinkubierten Ansatz zurückzuführen. Dass die initiale Menge an ppL nach der Zugabe von Sec62N-His<sub>6</sub> nicht reduziert wurde, lässt den Schluss zu, dass der Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> auf die Synthese von ppL nicht durch proteolytischen Abbau erfolgte, sondern durch eine Sec62N-His<sub>6</sub> vermittelte Hemmung der Translation.

# III.2.3.2 Die His<sub>6</sub>-Markierung von Sec62N-His<sub>6</sub> beeinflusst die Translation von Präprolaktin nicht

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die His<sub>6</sub>-Markierung von Sec62N-His<sub>6</sub> einen Effekt auf die Translation hat. Die positive Ladung dieser Markierung könnte mit negativgeladenen Gruppen in den Ribosomen interagieren und dadurch möglicherweise zu den oben beschriebenen Translationsarrest beitragen, obwohl bereits gezeigt wurde, dass die His<sub>6</sub>-Markierung von Sec62N-His<sub>6</sub> keinen Einfluss auf die Bindung dieses Proteins an Ribosomen hat. Die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem ppL in Anwesenheit von Puffer, His<sub>6</sub>-Peptid oder Sec62N-His<sub>6</sub> wurde analysiert. Die entsprechenden Translationsansätze wurden inkubiert und nach 10, 20 und 40 Minuten Proben entnommen. Nach SDS-PAGE wurden die Proben durch Phosphorimaging analysiert (siehe Abb. 39 A) und die Banden-intensitäten densitometrisch quantifiziert. Die ppL Synthese nach 40 Minuten in der Puffer-Kontrolle wurde als 100 % berechnet. Alle andere Proteinmengen wurden auf diese bezogen (siehe Abb. 39 B).

Das Ergebnis dieser Analyse (Abb. 39) zeigt, dass die Synthese in Anwesenheit von His<sub>6</sub>-Peptid genau so verläuft wie in der Puffer-Kontrolle. Das His<sub>6</sub>-Peptid konnte nicht mit Sec62N-His<sub>6</sub> kompetieren (siehe III.2.1.3) und, zeigt keinen Effekt auf die Synthese von ppL. Dies lässt den Schluss zu, dass die His<sub>6</sub>-Markierung von Sec62N-His<sub>6</sub> in keiner Weise an dem hemmenden Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> beteiligt ist, das heißt, dass diese Hemmung ausschließlich auf die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p zurückzuführen ist.



#### Abb. 39 : Effekt des His<sub>6</sub>-Markierung auf die in vitro-Synthese von Präprolaktin

Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde angesetzt (siehe II.6.2.1). Er wurde in drei Aliquots geteilt. Dem ersten Aliquot wurde MV-Puffer, dem zweiten Sec62N-His<sub>6</sub>-Lösung (in MV-Puffer; Endkonzentration im Ansatz 0,4  $\mu$ M), dem dritten His<sub>6</sub>-Peptid (Endkonzentration 22,5 mM) zugegeben. Die Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 10, 20 und 40 Minuten Proben entnommen wurden, die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. Die Graphik zeigt die Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese. Die ppL-Menge in der Puffer-Kontrolle nach 40 Minuten Inkubation wurde als 100 % der Synthese gesetzt. Die Synthese von ppL in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> und His<sub>6</sub>-Peptid wurde auf die Puffer-Kontrolle bezogen.

# III.2.3.3 Die Hemmung der Translation durch die N-terminalen Domäne von Sec62p erfolgt durch ihre Interaktion mit den Ribosomen.

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p mit Ribosomen interagiert, und dass sie die in vitro-Synthese von Präprolaktin hemmt. Um zu untersuchen, ob diese Hemmung durch die Interaktion dieser Domäne mit den Ribosomen ausgeübt wird, wurde getestet, ob die Translationshemmung durch Sec62N-His<sub>6</sub> von der Konzentration an Ribosomen im Translationsansatz abhängt. Dazu wurden den Effekt zweier verschiedenen Mengen an Ribosomen im Translationsansatz, der zuvor an Ribosomen depletiert wurde, auf die Translationshemmung durch Sec62N-His6 beobachtet. Als Kontrolle der Synthese in Abwesenheit von Sec62N-His6 wurde ein Ansatz mit der niedrigsten Menge an Ribosomen (1x) durchgeführt. Die Ribosomen wurden zuvor durch Zentrifugation von Kaninchen-Retikulozytenlysat durch ein Saccharose-Kissen gewonnen. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die radioaktiv markierten Proteine durch Phosphorimaging sichtbar gemacht und quantifiziert. Die Menge des jeweils in Gegenwart von Puffer synthetisierten Präprolaktins wurde als 100% gesetzt. Das Ergebnis dieser Quantifizierung ist in Abb. 40 dargestellt.

Bei einem Ansatz, der ohne Ribosomen inkubiert wurde, wurde keine Synthese festegestellt (Daten nicht gezeigt). Die Analyse (Abb. 40) zeigt, dass im Vergleich zum Pufferansatz die Synthese von ppL in Gegenwart von Sec62N-His<sub>6</sub> im Ansatz mit der equivalenten Menge an Ribosomen vollständig gehemmt wurde. Wird die Ribosomenmenge im Ansatz erhöht, so ist keine Hemmung der Translation im Vergleich zur Pufferkontrolle zu beobachten. Das deutet darauf hin, dass die Menge der eingesetzten Ribosomen limitierend in Bezug auf die Translationshemmung durch Sec62N-His<sub>6</sub> ist, und dass der inhibitorische Effekt dieses Proteins höchst wahrscheinlich auf die Interaktion mit translatierenden Ribosomen zurückgeht.



Abb. 40 : Die Translationshemmung durch Sec62N-His<sub>6</sub> ist von der eingesetzten Ribosomenmenge abhängig

Zur Gewinnung von Ribosomen wurden 102,5 µl eines Translationsansatzes mit 20% Kaninchen-Retikulozytenlysat und ppL-Transkript auf ein 50 µl Saccharose-Kissen (40 mM HEPES, pH 7,8, 0,5 M Saccharose, 150 mM KAc, 5 mM MgAc<sub>2</sub>, 2 mM DDT, 0,8 U/µI RNasin, 1:10.000 PLAC-Lösung (2 mg/ml Leupeptin und je 12 mg/ml PepstatinA, Antipain und Chymostatin in DMSO gelöst) geschichtet und bei 100.000 Upm im TLA 120.2 Rotor bei 2°C für 1,5 h zentrifugiert. Das Ribosomenpellet wurde in 2,5 µl MV-Puffer (siehe II.7.1) resuspendiert, was einer Ribosomenkonzentration von 7,5 µM entspricht. Zur Entfernung cytosolischer Ribosomen wurde ein Translationsansatz mit 20% Kaninchen-Retikulozytenlysat und ppL-Transkript zweimal bei 100.000 Upm im TLA 120.2 Rotor bei 2°C für 1,5 h zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde nach Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vier Aliquots geteilt. Zwei Aliquots wurde eine einfache Menge an Ribosomen (1x, entspricht etwa 0,15 µM) plus MV-Puffer bzw. Sec62N-His<sub>6</sub> (in MV-Puffer, Endkonzentration 1 µM) zugegeben. Dem dritten Aliquot wurde dieselbe Menge Sec62N-His<sub>6</sub> und die vierfachen Menge an Ribosomen (4x, entspricht etwa 0,6 µM) zugegeben. Dem letzten Aliquot, Negativkontrolle, wurde keine Ribosomen zugegeben (nicht gezeigt). Die Reaktion erfolgte bei 30°C, wobei nach 10, 20 und 40 min Proben entnommen wurden. Es folgte die Auftrennung der Proteine in den Proben durch SDS-PAGE. Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Phosphorimaging sichtbar gemacht, quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Menge des in Gegenwart von Puffer synthetisierten [<sup>35</sup>S]-ppL wurde als 100% gesetzt.

Im folgenden Versuch wurde weiter untersucht, ob die Inhibition der Translation durch die N-terminalen Domäne von Sec62p, durch seine Interaktion mit den translatierenden Ribosomen erfolgt. Dafür wurde getestet, ob die Stärke der Translationshemmung mit der Fähigkeit der vollständigen (Sec62N-His<sub>6</sub>) bzw. verkürzten Domäne (Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> und Sec62N98-180-His<sub>6</sub>) Ribosomen zu binden korreliert. Hierzu, wurde die *in vitro*- Synthese von radioaktiv markiertem ppL in Anwesenheit von Puffer, Sec62N-His<sub>6</sub>, oder zwei verschiedener Mengen an Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> bzw. Sec62N98-180-His<sub>6</sub> analysiert. Die entsprechenden Translationsansätze wurden inkubiert und Proben nach 10, 20, 30 und 40 Minuten entnommen. Nach SDS-PAGE wurden die Proben durch Phosphorimaging analysiert (siehe Abb. 41 A) und die Bandenintensitäten densitometrisch quantifiziert. Die [<sup>35</sup>S]-ppL Synthese nach 40 Minuten in der Puffer-Kontrolle wurde als 100 % berechnet. Alle andere Proteinmengen wurden auf diese bezogen (siehe Abb. 41 B).



# Abb. 41 : Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub>, Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub> und Sec62N98-180-His<sub>6</sub> auf die *in vitro*-Synthese von Präprolaktin

Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde vorbereitet (siehe II.6.2.1). Er wurde in sechs Aliquots geteilt. Den Aliquots wurde cMV500-Puffer, Sec62N-His<sub>6</sub>-Lösung (in MV-Puffer), Sec62N $\Delta$ N10-His<sub>6</sub>-Lösung (in cMV500-Puffer) oder Sec62N98-180-His<sub>6</sub>-Lösung (in cMV500-Puffer) zugegeben, so dass die Endkonzentration 1,0  $\mu$ M (1x) bzw. 2,0  $\mu$ M (2x) betrug. Die Salzkonzentration der Ansätze wurde mit cMV500-Puffer angeglichen. Die Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 10, 20, 30 und 40 Minuten Proben entnommen wurden, die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. **A)** Phosphorimaginganalyse der Proben. **B)** Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese. Die [<sup>35</sup>S]-ppL-Menge in der Puffer-Kontrolle nach 40 Minuten Inkubation wurde als 100 % der Synthese gesetzt. Die Synthese von [<sup>35</sup>S]-ppL in Anwesenheit der unterschiedlichen Proteine wurde auf die Puffer-Kontrolle bezogen und als Prozent ausgedrückt.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigt, dass bei der eingesetzten Proteinkonzentration Sec62N-His<sub>6</sub> die fast vollständige Hemmung der Translation hervorruft (etwa 5 % Restsynthese). Der Einsatz einer äquimolaren Konzentration an Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> zeigte zwar einen hemmenden Effekt auf die Synthese von ppL, welcher aber 14 Mal schwächer als die der vollständigen N-terminalen Domäne von Sec62p war. Die Zugabe der doppelten Proteinmenge an Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> brachte eine etwas höhere Hemmung. Bei Einsatz von Sec62N98-180-His<sub>6</sub>, welches nicht in der Lage ist, mit Ribosomen zu interagieren, war keine Hemmung der Proteinsynthese zu beobachten, im Gegenteil erhöhte sich die Synthese von [<sup>35</sup>S]ppL. Dieser Effekt war auch konzentrationsabhängig.

Der hemmende Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> und Sec62N∆N10-His<sub>6</sub> korreliert mit deren Fähigkeit, mit Ribosomen zu interagieren. Bei Sec62N98-180-His<sub>6</sub>, welches nicht an Ribosomen bindet, wurde keine Hemmung der Synthese von ppL hervorgerufen. Die vollständige N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p ist sowohl für die Interaktion mit Ribosomen als auch für eine effektive Hemmung der Translation essentiell. Dabei spielt die Anwesenheit des hochgeladenen Oligopeptids N-terminal dieser Domäne sowohl bei der Interaktion mit Ribosomen (siehe III.2.1.5) als auch bei dem Effekt dieser Domäne auf die Translation von Proteinen eine wichtige Rolle. Warum Sec62N98-180-His<sub>6</sub> die Synthese von ppL stimuliert, ist unklar. Die Korrelation zwischen Interaktion mit Ribosomen und Hemmung der Translation dieser Proteine lässt den Schluss zu, dass die Translationshemmung durch die Interaktion der rekombinanten Proteine mit den Ribosomen hervorgerufen wird.

#### III.2.3.4 Sec62N-His<sub>6</sub> hemmt die Translation auf Ebene der Initiation

In III.2.1.1 wurde anhand eines Ribosomenbindungsversuchs gezeigt, dass die Interaktion von Sec62N-His<sub>6</sub> mit Ribosomen zur Verdrängung des eEF2 von seiner Bindungsstelle am Ribosom führt. Um zu überprüfen, ob es sich bei der Hemmung der Translation die Sec62N-His<sub>6</sub> hervorruft, um eine Hemmung der Elongation handelt, wurde die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem ppL in Translation-sansätzen für 6 min gestartet, anschließend Puffer, einem Inhibitor der Initiation (ATA, Aurintricarboxylsäure), einem Inhibitor der Elongation (CHI, Cycloheximid), Sec62N-His<sub>6</sub> bzw. einer Kombination dieser Inhibitoren zugegeben und die Ansätze weiter inkubiert, wobei Proben nach 4, 8 und 16 Minuten entnommen wurden. Die synthetisierten Proteine wurden nach einer SDS-PAGE, durch Phosphorimaging analysiert (siehe Abb. 42 A) und densitometrisch quantifiziert. Die ppL-Synthese nach 16 Minuten in der Puffer-Kontrolle wurde 100 % gesetzt. Alle anderen Proteinmengen wurden auf diese bezogen (siehe Abb. 42 B und C).



Abb. 42 : Vergleich des Effekts von Sec62N-His<sub>6</sub>, Aurintricarboxylsäure (ATA) und Cycloheximid (CHI) auf die *in vitro*-Synthese von Präprolaktin (ppL)

Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde angesetzt (siehe II.6.2.1). Er wurde in sechs Aliquots geteilt, die für 6 min bei 30°C inkubiert wurden. Anschließend wurden cMV500-Puffer, ATA-Lösung, ATA-Lösung + CHI-Lösung, Sec62N-His<sub>6</sub> (in cMV500-Puffer), ATA-Lösung + Sec62N-His<sub>6</sub> oder ATA-Lösung + CHI-Lösung + Sec62N-His<sub>6</sub> zugegeben (siehe II.6.3). Die Konzentration von Sec62N-His<sub>6</sub> im Translationsansatz war 1  $\mu$ M. Die Translationsansätze wurden nun weiter bei 30°C inkubiert, wobei nach 4, 8, und 16 Minuten Proben entnommen und für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. **A)** Phosphorimaginganalyse der Proben. **B)** Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese. Die [<sup>35</sup>S]-ppL-Menge in der Puffer-Kontrolle nach 16 Minuten Inkubation wurde als 100 % der Synthese gesetzt. Die Synthese von ppL in Anwesenheit der unterschiedlichen Inhibitoren wurde auf die Puffer-Kontrolle bezogen. **C)** Ausschnitt der Quantifizierung zwischen 0-12 % ppL-Synthese.

In Abb. 42 zeigt die Pufferkontrolle die Gesamtsynthese von ppL, wenn die Elongation der während der ersten Inkubation initialisierten ppL-Ketten erfolgt und darüber hinaus neue Initiationsschritte während der zweiten Inkubation erlaubt werden. Die Zugabe von ATA vor der zweiten Inkubation dient zur Inhibition der Initiation von neuen ppL-Ketten. Da ATA nur die Initiation hemmt, erfolgt die weitere Elongation der während der ersten Inkubation initialisierten ppL-Ketten. So wird eine Synthese von 6 % (Ansatz 2) im Vergleich zur Puffer-Kontrolle (Ansatz 1) erreicht. Wird neben ATA ein Elongationsinhibitor wie CHI eingesetzt, so wird neben der Initiation zusätzlich die Elongation der während der ersten Inkubation initialisierten ppL-Ketten gehemmt. Es wird daher kein ppL vervollständigt (Ansatz 3). Wird dagegen Sec62N-His<sub>6</sub> zusätzlich zu ATA eingesetzt (Ansatz 5), so bewirkt es keine wietere Hemmung der Synthese von ppL. In diesem Fall erfolgt die Elongation der bereit initialisierten Ketten ebenfalls bis zur Vervollständigung. Sec62N-His<sub>6</sub> zeigt somit im Gegensatz zu CHI keinen Effekt auf die Elongation der Translation. Wenn Sec62N-His<sub>6</sub> allein eingesetzt wird, beobachtet man eine Hemmung der Translation, die vergleichbar ist mit der von ATA verursachten (Ansatz 4 vs. 2). Da Sec62N-His<sub>6</sub> keinen Effekt auf die Elongation auf Ebene der Initiation handeln. Die in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> erreichte Synthese beruht auf der Vervollständigung der während der ersten Inkubation initialisierten ppL-Ketten. Werden Sec62-His<sub>6</sub>, ATA und CHI eingesetzt, so ist die Hemmung der Translation durch die Wirkung von CHI auf die Elongation vollständig (Ansatz 6).

### III.2.3.5 GST-Sec62C hat keinen Effekt auf die Synthese von Präprolaktin

Die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p interagiert mit Ribosomen (siehe III.2.1) und hemmt dadurch die in vitro-Synthese eines sekretorischen Proteins (siehe III.2.3.1-III.2.3.3). Dafür spielt das Vorhandensein eines hoch geladenen Oligopeptids in dieser Domäne eine wichtige Rolle (siehe auch III.2). Im Abschnitt III.2.1.6 wurde gezeigt, dass die C-terminale cytosolische Region dieses Proteins (als GST-Sec62C), welche kein vergleichbares Oligopeptid in ihrer Sequenz aufweist, nicht in der Lage ist, mit Ribosomen zu interagieren. Um zu untersuchen, ob es dennoch einen Effekt auf die Translation ausübt, wurden zwei verschiedene Mengen an GST-Sec62C in einem in vitro-Translationsversuch für die Synthese von radioaktiv markiertem ppL eingesetzt. Parallel wurden eine Puffer-Kontrolle, eine GST-Kontrolle sowie ein Ansatz mit Sec62N-His<sub>6</sub> in Ab- und Anwesenheit von GST-Sec62C durchgeführt. Die letzten dienten der Untersuchung eines möglichen Effekts dieses Proteins auf die Fähigkeit von Sec62N-His<sub>6</sub>, die Translation zu hemmen. Die Ansätze wurden inkubiert und Proben wurden nach 10, 20 und 40 Minuten entnommen. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine durch Phosphorimaging ermittelt (siehe Abb. 43 A) und densitometrisch quantifiziert. Die ppL-Synthese nach 40 Minuten in der Puffer-Kontrolle wurde als 100 % berechnet. Alle andere Proteinmengen wurden auf diese bezogen (siehe Abb. 43 B).



Abb. 43 : Effekt von GST-Sec62C auf die in vitro-Synthese von Präprolaktin

Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde vorbereitet (siehe II.6.2.1). Er wurde in sechs Aliquots geteilt. Den Aliquots wurde Puffer, GST-Lösung (Endkonzentration 6,1  $\mu$ M), Sec62N-His<sub>6</sub>-Lösung (Endkonzentration 0,05  $\mu$ M), GST-Sec62C (Endkonzentration 0,025  $\mu$ M und 0,075  $\mu$ M (3x)), oder Sec62N-His<sub>6</sub> + GST-Sec62C (Endkonzentration 0,05  $\mu$ M + 0,025  $\mu$ M) zugegeben. Die Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 10, 20 und 40 Minuten Proben entnommen wurden, die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. **A)** Phosphorimaginganalyse der Proben. **B)** Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese. Die [<sup>35</sup>S]-ppL-Menge in der Puffer-Kontrolle nach 40 Minuten Inkubation wurde als 100 % der Synthese gesetzt. Die Synthese von [<sup>35</sup>S]-ppL in Anwesenheit der unterschiedlichen Rekombinantproteine wurde auf die Puffer-Kontrolle bezogen und als Prozent ausgedrückt.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigt für die Puffer-Kontrolle (Puffer) den Verlauf der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese, wenn keine zusätzlichen Proteine im Ansatz anwesend sind. Die Proteinsynthese dieses Ansatzes nach 40 Minuten Inkubation wurde 100 % gesetzt, und diente als Anhaltspunkt für die Quantifizierung der anderen Ansätze und Inkubationszeiten. GST wurde als Markierung der C-terminalen cytosolischen Region von Sec62p verwendet. Um zu überprüfen, ob ein möglicher Effekt des Proteins auf die Translation nicht auf diese Markierung zurückzuführen ist, wurde eine GST-Kontrolle durchgeführt (GST). Wurde die Translation in Anwesenheit von GST durchgeführt (6,1 µM), so stieg die Gesamt [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese

nach 40 Minuten Inkubation um etwa 50 %. Es ist hier zu beachten, dass GST kein ribosomassoziiertes Protein darstellt (siehe III.2.1.6). GST-Sec62C enthält eine klonierungsbedingte N-terminale His<sub>6</sub>-Markierung. Im Abschnitt III.2.3.2 wurde gezeigt, dass diese Markierung keinen Effekt auf die Synthese von [<sup>35</sup>S]-ppL ausübt. In Anwesenheit von GST-Sec62C war der Verlauf der [<sup>35</sup>S]-ppL-Synthese prinzipiell ähnlich wie in der Puffer-Kontrolle. Es zeigte sich eine leichte Erhöhung der Synthese, die bei steigender Konzentration an GST-Sec62C im Ansatz stieg und wahrscheinlich auf die GST-Markierung zurückzuführen war. Bei Einsatz von Sec62N-His<sub>6</sub> zeigte sich sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von zusätzlichem GST-Sec62C eine Hemmung der Proteinsynthese, die in beiden Fällen identisch war.

Zusammenfassend zeigt GST-Sec62C keinen Effekt sowohl auf die Synthese von [<sup>35</sup>S]-ppL als auch auf die Hemmung, die Sec62N-His<sub>6</sub> hervorruft. Hier wird wieder bestätigt, dass die Interaktion mit den Ribosomen essentielle Bedingung ist, um eine Translationshemmung hervorzurufen, und das N- und C-terminale Domäne von Sec62p nicht miteinander interagieren. Enthält die C-terminale Region von Sec62p eine Effektordomäne wie sein Homolog in der Hefe (siehe III.2.1.6), muss die Aktivität dieser Region auf einer anderen Ebene, als die der direkten Regulation der Translation am Ribosom, geschehen.

#### III.2.3.6 Sec62N-His<sub>6</sub> beeinflusst nicht die Translokation von Präprolaktin

Ob die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p nicht nur einen Einfluss auf die Translation sondern auch auf die Translokation sekretorischer Proteine haben kann, wurde in diesem Kapitel untersucht. Im Fall einer Funktion von Sec62p bei der Translokation würde eine Kompetition mit Sec62N-His<sub>6</sub> eine Reduktion der Translokationseffizienz verursachen. So wurden Synthese und Transport von radio-aktiv markierten ppL in Ab- oder Anwesenheit von Hundepankreasmikrosomen und hier jeweils in Ab- (Puffer-Kontrolle) oder Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub>, analysiert. Nach 10, 20, 30 und 40 Minuten wurden Proben der Translationsansätze entnommen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Phosphorimaging visualisiert (siehe Abb. 44 A). Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert, dabei wurde die [<sup>35</sup>S]-ppL-Menge bzw. die Summe aus [<sup>35</sup>S]-ppL- + [<sup>35</sup>S]-pL-Menge nach 40 Minuten Inkubation in beiden Puffer-

Kontrollen als 100 % Synthese gesetzt. Proteinsynthese der restlichen Inkubationszeiten und Proteinsynthese in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> wurden für die Quantifizierung auf die entsprechende Puffer-Kontrolle bezogen (siehe Abb. 44 B). In dieser Studie wurde die Prozessierung als Parameter für die Effizienz der Translokation des synthetisierten Proteins gemessen. Die Prozessierung in Anwesenheit von Mikrosomen wurde als Prozent von [<sup>35</sup>S]-pL des gesamt synthetisierten Protein ([<sup>35</sup>S]-ppL + [<sup>35</sup>S]-pL) ausgedrückt (siehe Abb. 44 C).





Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Präprolaktin ([<sup>35</sup>S]-ppL) wurde vorbereitet. Er wurde in zwei Aliquots geteilt. Dem ersten Aliquot wurde mit Puffer, dem zweiten Hundepankreasmikrosomen (RM) zu einer Endkonzentration von 3,5 % zugegeben (siehe II.7.1). Diese Ansätze wurden jeweils wieder in zwei Aliquots geteilt. Dem ersten wurde Puffer, dem zweiten Sec62N-His<sub>6</sub>-Lösung (Stammlösung in cMV500-Puffer) zu einer Endkonzentration von 1,0 µM zugegeben. Die so vollständigen Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 10, 20, 30 und 40 Minuten Proben entnommen wurden, die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. **A)** Phosphorimaginganalyse der Proben. **B)** Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-ppL- Synthese. Die [<sup>35</sup>S]-ppL-Menge bzw. [<sup>35</sup>S]-ppL- + [<sup>35</sup>S]-pL-Menge in den Puffer-Kontrollen nach 40 Minuten Inkubation wurde als 100 %-Synthese gesetzt. Die Synthese von [<sup>35</sup>S]-ppL bzw. ([<sup>35</sup>S]-ppL + [<sup>35</sup>S]-pL) in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> ohne bzw. mit Mikrosomen wurde auf die entsprechende Puffer-Kontrolle bezogen, und als Prozent ausgedrückt. **C)** Quantifizierung des <sup>35</sup>S-ppL-Anteils, das als Prolaktin ([<sup>35</sup>S]-pL) in den Mikrosomen prozessiert bzw. transloziert worden ist.

In Abb. 44 A ist ein eindeutiger Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> auf die Synthese von [<sup>35</sup>S]-ppL erkennbar, wenn keine Mikrosomen eingesetzt wurden (1 vs.2). Dieser zeigt

sich in einer fast vollständigen Hemmung (Abb. 44 B: Puffer / Puffer vs. Puffer / Sec62N-His<sub>6</sub>).

Unter Einsatz von Hundepankreasmikrosomen (RM) wird sowohl in der Puffer-Kontrolle als auch in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub>, der Grossteil von [<sup>35</sup>S]-ppL zu [<sup>35</sup>S]-pL prozessiert (3 und 4). Die Quantifizierung der Effizienz der Prozessierung bzw. Translokation ist in Abb. 44 C wiedergegeben. Sowohl in Ab- al auch in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> werden Prozessierungswerte von 85-90 % schon nach 20 Minuten erreicht. Es wird durch Sec62N-His<sub>6</sub> keine signifikante Veränderung in der Prozessierungseffizienz von [<sup>35</sup>S]-ppL verursacht. Daher kann eine Funktion von Sec62p bei der cotranslationalen Translokation nicht bestätigt werden. Wird die Gesamtsynthese ([<sup>35</sup>S]-ppL + [<sup>35</sup>S]-pL) beim Einsatz von Mikrosomen quantifiziert), so wird beobachtet, dass die Synthesehemmung, die Sec62N-His<sub>6</sub> verursacht, zum Teil durch die mikrosomalen Membranen unterdrückt wird (siehe Abb. 44 B: RM/Puffer vs. RM/Sec62N-His<sub>6</sub>).

# III.2.3.7 Die Ribosom-Translokon-Interaktion verhindert die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub>

Im vorherigen Versuch wurde beobachtet, dass die Hemmung, die die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p auf die Synthese von Präprolaktin ausübt, unter dem Einsatz von Mikrosomen zum Teil unterdrückt wird. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass in Abwesenheit von Mikrosomen die Ribosomen, die gerade ein Protein fertig synthetisiert haben, einen neuen Translationszyklus im Lysat-Milleu anfangen können, und in diesem Stadium wieder von Sec62N-His<sub>6</sub> gebunden und gehemmt werden können. In Anwesenheit von mikrosomalen Membranen würde dagegen ein Ribosom, das bereits eine Kette cotranslational synthetisiert hat, an der Membran assoziiert bleiben und somit seine Bindungsstelle für Sec62N-His<sub>6</sub> nicht mehr exponieren. Um dies zu untersuchen wurde der Transport von zwei Proteinen analysiert. Luciferase (Luc), ein nicht sekretorisches Protein und seine modifizierte Form, Präluciferase (pLuc), die das Signal Peptid von Präprolaktin N-terminal enthält (siehe II.1.8). Ist die Interaktion der Ribosomen mit den mikrosomalen Membranen dafür verantwortlich, dass die Hemmung der ppL-Synthese durch Sec62N-His<sub>6</sub> zum Teil aufgehoben wird, so müsste dies beim Einsatz eines nicht sekretorischen Proteins nicht vorkommen. Voraussetzung dafür ist, dass Sec62N-His<sub>6</sub> auch die Synthese eines nicht sekretorischen Proteins hemmt. Wie dies für Mtj1p gezeigt wurde (Dudek, 2002). Dies wurde in den nächsten Versuchen analysiert. Die Versuche wurden wie in III.2.3.6 beschrieben durchgeführt, mit der Variation, dass nun Luciferase (Luc) (siehe Abb. 45) bzw. Präluciferase (pLuc) (siehe Abb. 46) synthetisiert wurde, und dass die Proben nach 20,40 und 60 Minuten entnommen wurden.



Abb. 45 : Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> auf die *in vitro*-Synthese von Luciferase (Luc) in Ab- und Anwesenheit von Hundepankreasmikrosomen (RM)

Ein Translationsansatz für die *in vitro*-Synthese von radioaktiv markiertem Luciferase ([<sup>35</sup>S]-Luc) wurde angesetzt. Er wurde in zwei Aliquots geteilt. Dem ersten Aliquot wurde Puffer, dem zweiten Hundepankreasmikrosomen (RM) zu einer Endkonzentration von 2,5 % zugegeben (siehe II.7.1). Diese Ansätze wurden jeweils in zwei Aliquots wieder geteilt. Dem ersten wurde Puffer, dem zweiten Sec62N-His<sub>6</sub>-Lösung (Stammlösung in MV-Puffer) zu einer Endkonzentration von 1,0  $\mu$ M zugegeben. Die so vollständigen Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 20, 40 und 60 Minuten Proben entnommen wurden (dreifaches Volumen bei den Ansätzen mit Mikrosomen), die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. **A**) Phosphorimaginganalyse der Proben. **B**) Quantifizierung des Verlaufs der [<sup>35</sup>S]-Luc- Synthese. Die [<sup>35</sup>S]-Luc-Menge in den Puffer-Kontrollen nach 60 Minuten Inkubation wurde als 100 %- Synthese gesetzt. Die Synthese von [<sup>35</sup>S]-Luc in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> ohne und mit Mikrosomen wurde auf die entsprechende Puffer-Kontrolle bezogen und als Prozent ausgedrückt.

In Abb. 45 ist das Ergebnis der Untersuchung der Synthese von radioaktiv markiertem Luciferase (Luc) in Ab- und Anwesenheit von Hundepankreasmikrosomen (RM) gezeigt. Die Synthese des Proteins wird von Sec62N-His<sub>6</sub> in beiden Fällen beeinträchtigt (Abb. 45 A: 1 vs. 2 und 3 vs. 4). Nach Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde die Proteinsynthese in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> als Prozent der entsprechenden Puffer-Kontrolle berechnet. Die Synthese-Hemmung von Luciferase war in beiden Fällen fast vollständig, und ohne signifikante Abweichung, wenn mikrosomalen Membranen eingesetzt wurden. Wird ein nicht sekretorisches Protein synthetisiert, so ist keine Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Sec62N-His<sub>6</sub> zu erkennen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass ohne Signal Sequenz N-terminal der Luciferase-Kette, die Ribosomen zum Weg der cotranslationalen Transport nicht geführt werden, und somit mit den mikrosomalen Membranen nicht interagieren. Die Ribosomen würden im Lysat-Milleu bleiben, und nach Beendigung einer Luciferase-Kette würden wieder auf Sec62N-His<sub>6</sub> exponiert sein. Dass bei der Synthese eines sekretorischen Proteins, (ppL), aber nicht bei der Synthese eines nicht sekretorischen Proteins (Luc), eine Aufhebung der von Sec62N-His<sub>6</sub> verursachten Translationshemmung in Anwesenheit von Mikrosomen zu beobachten ist, deutet darauf hin, dass die Interaktion der Ribosomen mit den Translokons für diese Effekt (Aufhebung der Translationshemmung) verantwortlich ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Bindungsstelle von Sec62N-His<sub>6</sub> am ribosomalen für die Interaktion mit den Translokon bestimmten Bereich liegt.

Um die vorherige Vermutung zu bestätigen, wurde untersucht, ob bei der Synthese eines mutierten Luciferase, welches das Signal Peptid von Präprolaktin enthält, die Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Sec62N-His<sub>6</sub> wieder eintritt. Derselbe Versuch wie zuvor wurde für die Synthese von radioaktiv markiertem Präluciferase ([<sup>35</sup>S]-pLuc) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 46 gezeigt.

Abb. 46 A zeigt, dass bei Anwesenheit von Hundepankreasmikrosomen (RM) ein Teil der Präluciferase prozessiert wird. Da Luciferase zwei Glykosilierungsstellen besitzt (Tyedmers *et al.*, 1996), wird es nach der Prozessierung des Signal Peptides im Lumen der Mikrosomen modifiziert, und in der Phosphorimaging-Analyse treten zwei neue Banden oberhalb der unprozessierten Form auf. Sec62N-His<sub>6</sub> übt seinen inhibitorischen Effekt auf die Synthese des Luciferases mit Signal Peptid in Ab- oder Anwesenheit von Mikrosomen bis zur fast vollständigen Hemmung aus. Bei Einsatz dieses sekretorischen Proteins wird die Translationshemmung, im Gegensatz wie bei ppL, nicht zum Teil aufgehoben. Dies kann dadurch erklärt

150

werden, dass Präluciferase ein 2,5-fach größeres Protein als Präprolaktin ist. Viele von den Translokon-assoziierten Ribosomen synthetisieren die Präluciferase nicht vollständig, was in der Phosphorimager-Analyse als dunkler Schmier unter den Banden der vollständig synthetisierten Proteine zu sehen ist. Die Kinetik des Prozesses bestimmt, dass weniger Ribosomen an der Membran neue Synthese-Zyklen anfangen, und es kommt daher nicht zu der zu erwartenden Steigerung der



Abb. 46 : Effekt von Sec62N-His<sub>6</sub> auf die *in vitro*-Synthese von Präluciferase (pLuc) in Abund Anwesenheit von Hundepankreasmikrosomen (RM)

Ein Translationsansatz für die in vitro-Synthese von radioaktiv markiertem Präluciferase (1<sup>35</sup>S]-pLuc) wurde vorbereitet. Er wurde in zwei Aliquots geteilt. Dem ersten Aliquot wurde Puffer, dem zweiten Hundepankreasmikrosomen (RM) zu einer Endkonzentration von 2,5 % zugegeben (siehe II.7.1). Diese Ansätze wurden jeweils in zwei Aliquots wieder geteilt. Dem ersten wurde Puffer, dem zweiten Sec62N-His<sub>6</sub>-Lösung (Stammlösung in MV-Puffer) zu einer Endkonzentration von 1,0 µM zugegeben. Die so vollständigen Translationsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wobei nach 20, 40 und 60 Minuten Proben entnommen wurden (dreifaches Volumen bei den Ansätzen mit Mikrosomen), die für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Ergebnis durch Phosphorimaging ermittelt. A) Phosphorimaginganalyse der Proben. B) Quantifizierung des Verlaufs der [35S]-pLuc-Synthese. Die [35S]-pLuc-Menge bzw. ([35S]-pLuc- + [<sup>35</sup>S]-Luc\*- + [<sup>35</sup>S]-Luc\*\*-Menge) in den Puffer-Kontrollen nach 60 Minuten Inkubation wurden als 100 %-synthese gesetzt. Die Synthese von  $[^{35}S]$ -pLuc bzw. ( $[^{35}S]$ -pLuc +  $[^{35}S]$ -Luc\* +  $[^{35}S]$ -Luc\*\*) in Anwesenheit von Sec62N-His<sub>6</sub> ohne und mit Mikrosomen wurde auf die entsprechenden Puffer-Kontrollen bezogen und als Prozent ausgedrückt. Die Stern-Symbole bei [<sup>35</sup>S]-Luc\* und [<sup>35</sup>S]-Luc\*\* deuten auf das Glykosilierungsgrad der reifen Proteine. C) Quantifizierung des [35S]-pLuc-Anteils, das in den Mikrosomen prozessiert bzw. transloziert worden ist ([<sup>35</sup>S]-Luc\* + [<sup>35</sup>S]-Luc\*\*).

Proteinsynthese. Die Prozessierung von [ $^{35}$ S]-pLuc nach 40 und 60 min Synthese wurde quantifiziert (Abb. 46 C). Die erreichten Werte von etwa 70 % stellen eine niedrigere Effizienz dieses Prozesses für pLuc im Vergleich zu ppL dar. Dies bedeutet, dass netto weniger Ribosomen an der Membran vor dem inhibitorischen Effekt von Sec62N "geschützt" werden und dort zur Steigerung der Proteinsynthese beitragen können. Präluciferase erweist sich daher als nicht geeignet, um den Effekt der Ribosom-Translokon-Interaktion auf die Bindung von Sec62N-His<sub>6</sub> zu bestätigen.

## **IV.DISKUSSION**

# IV.1 Über die Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von BiP bei späten Schritten der cotranslationalen Translokation

Der erste Schritt in der Sekretion der meisten Säuger-Proteine ist ihr Transport (Translokation) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulum (ER; Blobel und Dobberstein, 1975a). Dies geschieht im Säuger hauptsächlich während der Synthese des sekretorischen Proteins, d.h. cotranslational (siehe I.3). Die Translokation erfolgt in drei aufeinander folgenden Schritten: die Assoziation des präsekretorischen Proteins mit der ER-Membran (Targeting), die Insertion in die Translokationspore und schließlich das Durchqueren der Pore bis zum ER-Lumen (Elongation bzw. Termination). Dafür sind neben der Translokationsmaschinerie an der ER-Membran auch luminale Proteine notwendig (Klappa *et al.*, 1991; Nicchitta und Blobel, 1993; Dierks *et al.*, 1996).

BiP, ein luminales Chaperon der Hsp70-Familie (siehe I.2.1.1), ist wahrscheinlich an allen Schritten der Translokation beteiligt (siehe I.3.2). Seine Beteiligung an der Termination der Translokation wurde durch die Verwendung von aus mikrosomalen Membranen hergestellten Proteoliposomen, die isoliertes BiP enthielten, gezeigt. Die Anwesenheit von BiP erhöhte den netto Transport eines sekretorischen Proteins ins Lumen der Vesikel und es wurde darüber hinaus gezeigt, dass dieses auf eine direkte Interaktion von BiP mit dem Substrat zurückzuführen ist. So wurde vorgeschlagen, dass BiP für eine effiziente Translokation eines Substrates in Richtung Lumen benötigt wird ("Ratchet Mechanismus") (Tyedmers, 2001; Tyedmers *et al.*, 2003). Da bei der cotranslationalen Translokation eines Substrats in Vesikel, die keine luminalen Proteine enthalten, bereits prozessierte und luminal modifizierte Translokationssubstrate zurück ins Cytosol gelangen können (Nicchitta und Blobel, 1993), besteht die Möglichkeit, dass BiP die Effizienz der Translokation erhöht indem es bereits translozierte Proteine bindet und deren Export ins Cytosol verhindert ("Trapping Mechanismus").

# IV.1.1 BiP erhöht die Effizienz der Translokation durch sowohl "Ratchet" als auch "Trapping" Mechanismus

Um zu untersuchen, durch welchen Mechanismus BiP die Effizienz der Translokation erhöht, wurde das System der Proteoliposomen verwendet. Das Protein Avidin, das eine starke Affinität zu Biotin hat, wurde in Proteoliposomen eingeschlossen und als artifizieller Bindungspartner eines biotinylierten Substrats verwendet (siehe III.1.1).

Es wurden zwei sekretorische Proteine, Präprolaktin (ppL) und seine verkürzte Form, Präprolaktin86mer (ppL86mer) in vitro synthetisiert (mit Biotin und radioaktiver Markierung) und ihre Translokation in Proteoliposomen untersucht. Die Biotinylierung erfolgt über die Lysinreste, die bei ppL86mer nur C-terminal vorhanden sind. In Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin konnte die Transporteffizienz von ppL (III.1.3), jedoch wenig die Transporteffizienz von ppL86mer (III.1.4) erhöhen. Ein falsch positives Ergebnis für ppL wurde in einer Kontrolluntersuchung durch den Einsatz von nicht biotinyliertem ppL ausgeschlossen (III.1.2). Die schwache Stimulierung der Translokation von ppL86mer lag nicht an einem technischen Fehler beim Einschließen von Avidin in die Proteoliposomen während ihrer Herstellung, denn die Proteoliposomen mit Retikuloplasma, die eine positive Kontrolle für die Herstellung darstellten, waren aktiv. Durch den Vergleich der Transporteffizienzerhöhung von ppL und ppL86mer durch Avidin kann der Anteil an "Ratchet" und "Trapping" Mechanismus ermittelt werden, durch den Avidin die Stimulierung der Translokation von ppL ausübt (siehe III.1.1). Dies kann dann auf BiP übertragen werden (siehe unten). Für die Quantifizierung der Translokationseffizienz und somit des Effekts von Avidin auf die Translokation von ppL und ppL86mer wurde die radioaktive Markierung der Substrate verwendet. Da aber der Effekt von Avidin auf die eingesetzten Substrate von der Biotinylierung der naszierenden Ketten abhängt, und ppL86mer weniger zu biotinylierende Stellen als ppL hat, war es möglich, dass die niedrige Stimulierung der Translokation von ppL86mer durch Avidin teilweise an einer niedrigeren Biotinylierung des Proteins lag. Bereits von Hoeltke et al. (1995) wurde für andere Substrate gezeigt, dass beim Einsatz des auch hier für die Biotin-in vitro-Translation verwendeten Retikulozytenlysates wahrscheinlich nur wenige zu biotinylierende Lysinreste markiert wurden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Biotinylierungsgrad der hier eingesetzten Substrate untersucht. Es zeigte sich, dass obwohl alle Ketten radioaktiv markiert wurden, nur ca. 40 % der ppL-Ketten und ca. 20 % der ppL86-Ketten biotinyliert wurden (III.1.5). So war es nicht möglich, einen direkten Vergleich des Effekts von Avidin auf ppL und ppL86mer durchzuführen. Die Biotinylierung der Substrate wurde durch zusätzliche Biotin-Lysin-tRNA<sup>Lys</sup> im Translationsansatz verbessert, aber es wurde keine vollständige Biotinylierung erreicht (III.1.6). Um ausschließlich die Translokation der gleichzeitig radioaktiven und biotinylierten ppL- und ppL86mer-Ketten zu untersuchen, wurden Streptavidin-"Magneticbeads" für die Isolierung der biotinylierten Ketten eingesetzt (III.1.7). Dies erlaubte die direkte Berechnung des Anteils an "Trapping Mechanismus" und "Ratchet Mechanismus", durch den Avidin die Stimulierung der Translokation von ppL bewirkt. Tyedmers et al. (2003) zeigten, dass der Effekt von BiP auf die Translokation von ppL dem von Avidin für biotinyliertes ppL gleicht. So wurde festgestellt, dass BiP direkt mit dem zu translozierenden Substrat interagiert und dadurch die Effizienz der Translokation verbessert. Die hier eingesetzte Methode unter Verwendung von Streptavidin-Beads zeigt darüber hinaus, dass die Erhöhung der Transporteffizienz eines Substrats, die BiP bewirkt, durch seine direkte Interaktion mit dem Substrat vor allem während (64 %) aber auch nach (36 %) seiner Translokation durch das Translokon geschieht.

In III.1.4 wurde ein Anteil von 20 % an "Trapping Mechanismus" berechnet. Diese Quantifizierung basierte auf dem Vergleich zwischen der Aktivität von Avidin auf ppL und auf ppL86mer, wobei wie später gezeigt ppL86mer nur zur Hälfte im Vergleich zu ppL biotinyliert wurde. Wenn die Biotin-Markierung von ppL86mer ähnlich wie die von ppL gewesen wäre, so wäre der doppelte Effekt auf die Translokation von ppL86mer zu erwarten, und der Anteil an "Trapping Mechanismus" wäre daher auf etwa 40 % hochgerechnet, was mit den oben dargestellten Ergebnisse übereinstimmt. So agiert BiP bei späten Schritten der Translokation durch beide Mechanismen, "Ratchet" und "Trapping", um den Transport von sekretorischen Proteinen in das endoplasmatische Retikulum zu sichern (siehe IV.1).

Die Stimulation der Translokation, die in Proteoliposomen eingeschlossenes Avidin ausübt, ist ausschließlich auf seine direkte Interaktion mit dem zu translozierenden Substrat zurückzuführen. Die Proteoliposomen, die als Kontrolle die gesamten luminalen Proteine (Retikuloplasma) enthielten, zeigten ebenfalls eine Stimulierung der Translokation von biotinyliertem Präprolaktin. Die Effizienz der

155

Translokation in Proteoliposomen hängt direkt von der Konzentration an luminalen Proteinen, die die Vesikel enthalten, ab (Nicchitta und Blobel, 1993). Die Konzentration an Retikuloplasma, welche die hier verwendete Proteoliposomen enthielten, wurde für eine maximale Translokationseffizienz ausgewählt (Abb. 14). Da die Erhöhung der Translokationseffizienz in Anwesenheit von Retikuloplasma und Avidin ähnlich war, wurde bestätigt, dass die Wirkung des Retikuloplasmas auf die Translokation wie bei Avidin auf eine direkte Interaktion mit dem Substrat zurückzuführen ist und nicht an anderen Eigenschaften des Retikuloplasmas, wie einer möglichen Chaperon-Aktivität, liegt (Tyedmers et al., 2003). Auf der Basis des Proteintransports in Mitochondrien wurde für den posttranslationalen Transport in der Hefe vorgeschlagen, dass das BiP-Homologe, Kar2p, durch ein aktives Ziehen der zu translozierenden Kette deren Translokation ins Lumen ermöglicht. Dafür wäre neben der Bindung des Substrats die gleichzeitige Verankerung von Kar2p an einem membranassoziierten Protein notwendig (Glick, 1995). Die Tatsache, dass Avidin, das nur die Eigenschaft besitzt die naszierende Kette zu binden, die Translokationseffizienz im gleichen Maß wie das Retikuloplasma steigern kann deutet darauf hin, dass BiP die Translokatioseffizienz nicht durch ein aktives Ziehen, sondern nur durch Bindung des Substrats erhöht.

Bei der Anwendung von leeren Proteoliposomen fand trotz der Depletion an luminalen Proteinen eine Assoziation des Vorläuferproteins mit dem Translokon, als Prozessierung der Signalsequenz beobachtet, statt. Dies widerspricht scheinbar der Beobachtung, dass luminale ATP-bindende Proteine für die Assoziation der naszierenden Kette mit der Translokationsmaschinerie notwendig sind (Klappa et al., 1991; Zimmermann et al., 1991; Dierks et al., 1996). In diesen Arbeiten wurden die ATPbindenden Proteine durch Behandlung mit 8-azido-ATP bzw. durch Isolierung mittels ATP-Agarose vollständig inaktiviert bzw. depletiert. Bei der Herstellung der leeren Proteoliposomen für diese Arbeit wurde BiP wahrscheinlich nicht vollständig depletiert. Da BiP für die luminale Versiegelung der inaktiven Translokons mit diesen assoziiert (Hamman et al., 1998; Alder et al., 2005), ist es möglich, dass dieser Anteil an BiP die Solubilisierung der mikrosomalen Membranen bei der Herstellung der Proteoliposomen übersteht und somit weiter mit dem Translokon an der Membran der "leeren Proteoliposomen" assoziiert bleibt. Es wäre daher genügend BiP in diesen Proteoliposomen anwesend um die Assoziation des Substrats für die Translokation zu ermöglichen, jedoch wäre es nicht ausreichend für eine effiziente Translokation.

### IV.1.2 Modell zur Funktion von BiP bei der cotranslationalen Translokation

Das Säuger Hsp70-Chaperon BiP hat während der cotranslationalen Translokation von Proteinen in das ER mehrere Funktionen. Trotzdem wird diskutiert, ob BiP wirklich wesentlich für diesen Prozess ist. Zum einen wurde gezeigt, dass Proteoliposomen aus isolierten Komponenten und ohne BiP, wenn auch nicht mit der maximalen Effizienz, so doch transportfähig waren (Görlich und Rapoport, 1993). Dasselbe Verhalten wurde für Hefe-Proteoliposomen ohne Kar2p, dem Homolog von BiP, beobachtet (Panzner et al., 1995). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die vollständige Inaktivierung von BiP aus nativen mikrosomalen Membranen zu einer Blockade der Translokation führt (Klappa et al., 1991; Zimmermann et al., 1991). Ebenfalls haben Mutationsstudien in Hefen gezeigt, dass Kar2p in vitro und in vivo essentiell für den co- und posttranslationalen Transport ist (Vogel et al., 1990; Nguyen et al., 1991; Brodsky et al., 1995; Young et al., 2001). Es ist daher möglich, dass die in vitro-Untersuchungen von Görlich und Panzner nicht vollständig auf die in vivo Bedingungen übertragbar sind. Weitere Untersuchungen mit rekonstituierten Mikrosomen aus Säuger haben gezeigt, dass luminale Proteine die Effizienz der Translokation verbessern (Nicchitta und Blobel, 1993), wobei BiP eine direkte Rolle spielt (Tyedmers et al., 2003). In Hefen ist darüber hinaus gezeigt worden, dass ein effizienter Nukleotidaustausch, der für die Funktion der Hsp70-Chaperone notwendig ist, ebenfalls Bedingung für den Erfolg der Translokation ist (Tyson und Stirling, 2000). Durch diese und weitere Untersuchungen zum Transport von Proteinen in das ER ist die Vielseitigkeit von BiP in diesem Prozess gezeigt worden.

Der Kern des Translokons besteht wahrscheinlich aus zwei Sec61-Komplexen, wobei jeder Komplex eine wässrige Pore besitzt (Mitra *et al.*, 2005). Vor der Translokation liegt jeder Sec61-Komplex im Translokon wahrscheinlich mit je einem Molekül Sec62p und Sec63p assoziiert vor (Tyedmers *et al.*, 2000). Die ER-Membran stellt eine Permeabilitätsbarriere für Ionen und viele Moleküle dar (Le Gall *et al.*, 2004). Um diese Barriere zu erhalten, werden vor der Translokation beide Sec61-Komplexe eines Translokons von deren luminalen Seite durch BiP verschlossen (Hamman *et al.*, 1998). Dafür bindet BiP in seiner ADP-gebundenen Form durch seine Substratbindungsdomäne an eine Komponente des Translokons. Durch Interaktion mit der J-Domäne eines Hsp40-Membranproteins, wahrscheinlich Sec63p, wird BiP aktiviert (ATP-Hydrolyse) und gleichzeitig in die Nähe des Translokons gebracht um

157

diese Funktion auszuüben. Erst nach einem Nukleotidaustausch wird BiP vom Translokon abgehen (Alder et al., 2005). Diese Interaktion von BiP mit dem Translokon ist nicht permanent. Durch die Interaktion von BiP mit Nukleotidaustauschfaktoren, die im Lumen des ER sich befinden, würde BiP wieder in seine ATP-gebundenen Form gebracht. Diese Form wäre jedoch nur sehr kürzlebig, denn durch die unmittelbare Nähe der J-Domäne von Sec63p, würde BiP wieder mit dem Translokon stabil interagieren und somit diesen weiter in seinem geschlossenen Zustand halten. In diesem Zustand würde die Positionierung der Sec61-Komplexe im Translokon einen zentralen hydrophoben Bereich lassen, wodurch kleine neutrale Moleküle diffundieren könnten. Dies ist in Übereinstimmung mit der von Mitra et al. (2005) beobachteten Struktur des Translokons im inaktiven Zustand und mit der translokationsabhängigen Diffusion kleiner Moleküle (Roy und Wonderlin, 2003). Nach dem Targeting des Ribosom-naszierende Kette-SRP Komplexes an die ER-Membran kommt es zur instabilen Assoziation (Salz sensitiv) des Ribosomnaszierende Kette-Komplexes mit dem Translokon, wobei die naszierende Kette zugänglich für cytosolische Proteine ist und die Interaktion von BiP mit dem Translokon noch besteht. Nachdem die naszierende Kette eine Länge von mehr als 70 Aminosäureresten erreicht hat, ist die Assoziation des Ribosoms mit dem Translokon stabil (Salz resistent), die naszierende Kette ist in der Translokationspore inseriert, die Assoziation von BiP hat sich gelöst (Crowley et al., 1994; Jungnickel und Rapoport, 1995; Hamman et al., 1998) und die Konformation des Translokons hat sich so verändert, dass sich die Poren der Sec61-Komplexe zu einer großen zentralen Pore vereinigt haben (Wirth et al., 2003; Driessen, 2005; Mitra et al., 2005). In dieser aktiven Konformation ist das Translokon für kleine neutrale Moleküle undurchlässig (Roy und Wonderlin, 2003). Es ist möglich, dass sich in diesem Zustand die Interaktion von Sec62p und Sec63p mit dem Translokon verändert hat bzw. nicht mehr besteht (siehe IV.2.5). Damit die Insertion bzw. Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon erfolgt, werden luminale ATP-bindende Proteine, wahrscheinlich BiP und/oder Grp170, benötigt (Klappa et al., 1991; Zimmermann et al., 1991; Dierks et al., 1996). Hierfür wurde ebenso ein Zusammenspiel dieser Proteine mit J-Domänen enthaltenden Membranproteinen wie Sec63p vorgeschlagen (Klappa et al., 1991; Zimmermann et al., 1991; Dierks et al., 1996). Auch in Hefe wurde für Kar2p (das BiP-Homologe) gezeigt, dass es zusammen mit Sec63p und Sec61p Einfluss auf die Interaktion der naszierenden Kette mit dem Translokon hat (Sanders et al., 1992; Brodsky et al., 1995; Pilon et al., 1998). Ebenfalls wurde für Lhs1p, das Grp170-Hefe-Homologe, gezeigt, dass es an diesem Schritt der Translokation beteiligt ist (Craven et al., 1996). Der Translokationsprozess erfordert neben der ATP-Hydrolyse den nachfolgenden Nukleotidaustausch für einen korrekten ATP/ADP-Zyklus von Hsp70-Chaperonen wie BiP (Tyson und Stirling, 2000). Sowohl für Grp170 im Säuger als auch für Lhs1p in der Hefe wurde gezeigt, dass sie eine Funktion als Nukleotidaustauschfaktor von BiP bzw. Kar2p haben (Steel et al., 2004; Andreas Weitzmann, eingereicht). In der Hefe verursacht die gleichzeitige Depletion von Lhs1 und Sil1p (ein UPR induzierbarer Nukleotidaustauschfaktor von Kar2p) eine vollständige Blockade der Translokation (Tyson und Stirling, 2000). Die Rolle von Grp170 bzw. Lhs1p in frühen Schritten der Translokation könnte daher sein, als Nukleotidaustauschfaktor von BiP bzw. Kar2p zu agieren. In der ATP-gebundenen Form würde nun BiP bzw. Kar2p die Öffnung der Pore auf der luminalen Seite erlauben. Es ist vorstellbar, dass BiP durch einen einzigen Mechanismus sowohl das Verschließen der Pore als auch die Interaktion der Signalseguenz mit dem Translokon reguliert. So könnte der Wirkungsmechanismus von BiP darin bestehen, Konformationsänderungen des Translokons, welche für die Interaktion der Signalsequenz und für die Öffnung der Pore notwendig sind, durch Interaktion mit dem Translokon zu verhindern. Erst nach Ablösung der BiP-Interaktion durch die Beteiligung von Grp170 könnte die Bewegung in Richtung Lumen von einem Transmembransegment, das im Kern der Pore diese verschließt, zur Öffnung der Translokationspore führen (van den Berg et al., 2004; Driessen, 2005; Mitra et al., 2005). Auf diese Weise würde Grp170 durch seine Aktion über BiP indirekt die Interaktion der naszierenden Kette mit dem Translokon regulieren. Nach Beendigung der Translokation würde die Reassoziation von BiP mit dem Translokon die Zurückbewegung des TM-Segmentes induzieren und damit die Translokationspore wieder verschließen. Die Dissoziation von BiP von der luminalen Seite des Translokons wird von den Ereignissen auf der cytosolischen Seite induziert. So würden Veränderungen in der Ribosom-Translokon Assoziation wahrscheinlich durch das translokonassoziierte Sec62p zu Grp170 und Sec63p und somit zu BiP vermittelt (siehe IV.2.5.3).

Kürzlich publizierte Modelle zur Struktur des Translokons, die auf der Röntgen-Struktur des prokaryontischen Homologes des Sec61-Komplexes basieren, postulieren, dass das Translokon allein durch seine strukturellen Eigenschaften in Abwesenheit einer zu translozierenden Kette verschlossen ist und stellen somit

159

eine Rolle von BiP bei der Kontrolle der Permeabilität der Membran in Frage. In diesem Modell würde die Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon die Verschiebung des Transmembransegmentes im Kern der Pore in Richtung Lumen verursachen und somit zur Öffnung der Pore führen. Nach Beendigung des Transports würde sich das Segment ohne Beteiligung zusätzlicher Proteine auf seiner Ausgangsposition zurückbewegen und die Pore somit verschließen. Dies würde jedoch nicht erklären, wie das Translokon für die Retrotranslokation von fehlgefalteten Proteinen von seiner luminalen Seite geöffnet wird (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997). Wenn jedoch die Bewegung des Transmembransegments nicht nur durch Signalsequenzen sondern auch durch BiP reguliert wäre, könnte auch eine direkte, luminale Kontrolle der Öffnung der Pore für den Retrotransport erklärt werden.

Nachdem die Translokationspore geöffnet wird, erfolgt die weitere Synthese und der gleichzeitige Durchgang der naszierenden Kette durch die Pore, bis sie vollständig das Lumen des ER erreicht (Termination der Translokation). Während des Transports erfolgt die Abspaltung der SS (Prozessierung) durch den Signalpeptidase-Komplex (Blobel und Dobberstein, 1975c; Jackson und Blobel, 1977). BiP ist an der Termination der Translokation durch direkte Interaktion mit dem zu translozierenden Protein beteiligt, wodurch es die Effizienz dieses Prozesses verbessert (Tyedmers et al., 2003). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BiP den netto Transport sekretorischer Proteine ins Lumen des ER erhöht, indem es sowohl deren Transport in Richtung Lumen dirigiert (Ratchet Mechanismus) als auch den Export der bereits translozierten Proteine zum Cytosol verhindert (Trapping Mechanismus). Dafür interagiert BiP wie für seine Chaperon-Aktivität in seiner ADP-gebundenen Form mit hydrophoben Peptidmotiven des sekretorischen Proteins (siehe I.2). Um über den Ratchet Mechanismus die Translokation eines Substrats zu unterstützen, wird BiP durch die Anwesenheit von J-Domäne enthaltenden Proteine wie Sec63p oder Mtj1p in der Nähe des Translokons aktiviert und so in die richtige Lage gebracht, um stabil mit der naszierenden Kette während ihrer Translokation zu interagieren. Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für das Hefe-System beschrieben, wo die Interaktion von Kar2p mit dem Substrat für den Erfolg des posttranslationalen Transports notwendig ist (Matlack et al., 1999). Auch für den cotranslationalen Transport wurde in der Hefe sowohl in vivo als auch in vitro eine essentielle Rolle von Kar2p und Sec63p gezeigt, wofür die J-Domäne von Sec63p notwendig ist (Vogel et al., 1990; Nguyen et al., 1991; Brodsky et al., 1995; Young et al., 2001; Willer et al., 2003a). Dass BiP durch einen Ratchet Mechanismus die Translokationseffizienz erhöht, wird durch folgende Beobachtungen bekräftigt: Naszierende Ketten, die sogar noch am Ribosom gebunden sind, können zurück ins Cytosol gleiten. Dieses Phänomen wurde bei prozessierten Ketten beobachtet, wenn keine Translationsaktivität stattfand (Ooi und Weiss, 1992). Die Elongation eines Proteins erfolgt nicht gleichmäßig sondern mit Pausen (Wolin und Walter, 1988; Rabinovich und Kreinin, 1991; Doohan und Samuel, 1992). Die zu translatierenden Ketten könnten während dieser Pausen zurück ins Cytosol gleiten und nach Beendigung der Synthese dorthin gelangen. Die Interaktion von BiP während der Translokation verhindert dies und steigert somit die Translokationseffizienz. Für die Interaktion von BiP mit einer Kette, die gerade transloziert wird, ist die Anwesenheit von hydrophoben Peptidmotiven notwendig. Die Lokalisierung dieser Motive im N-terminalen Bereich des Proteins bzw. bevor es zu einer Pause in der Elongation kommt wäre für die Retention des Proteins im Lumen durch Interaktion mit BiP von besondere Bedeutung. Der Transport von Proteinen die im N-terminalen Bereich solche Sequenzen nicht enthalten wird wahrscheinlich von anderen Faktoren ermöglicht. Während der Synthese und des Transports einer Polypeptidkette können Modifizierungen wie ihre N-Glykosylierung durch die membranassoziierte Oligosaccharyltransferase stattfinden. So könnten diese Glykoproteine vom Chaperon Calnexin direkt in der Umgebung des Translokons oder von Calretikulin im Lumen gebunden werden und ein mögliches Zurückgleiten ins Cytosol würde so verhindert. Die Faltung eines Proteins beginnt in vivo schon während seiner Translokation (Fedorov und Baldwin, 1997; Kramer et al., 2001). Für Faltungskatalysatoren wie Proteindisulfidisomerasen und Cyclophiline wurde durch Quervernetzungsuntersuchungen gezeigt, dass sie mit translozierenden Proteinen während der späten Schritte des Transports interagieren (Klappa et al., 1995; Volkmer et al., 1997). So könnte ein Protein im Translokationskanal nur so weit zurückgleiten, wie es noch entfaltet vorliegt. Da die Faltung des Proteins trotzdem fortgesetzt wird, würde es so letztendlich vollständig ins Lumen gelangen (Ooi und Weiss, 1992). Für diese Substrate wäre eine Interaktion mit BiP für die Vollendung des Transports nicht notwendig, aber falls diese Proteine für die Bindung von BiP bestimmte Motive enthielten, würde die Interaktion mit BiP eine Beschleunigung des Durchgangs durch das Translokon zur Folge haben.

161

Nachdem die naszierende Kette die Pore vollständig verlassen hat, würde das Translokon in einer offenen Konformation bleiben, bis durch Reassoziation mit BiP die Translokationspore wieder verschlossen würde. Bis zur Verschließung der Pore wäre der retrograde Transport des gerade translozierten Proteins durch die offene Pore möglich. BiP interagiert mit den bereits translozierten Ketten im Lumen weiter bis sie korrekt gefaltet werden. Ein Protein, das ohne Interaktion mit BiP ins Lumen des ER gelangt, kann dort falls es C-terminale Bindungsmotive für BiP besitzt mit diesem ebenfalls interagieren. Diese Situation würde in den hier durchgeführten Analysen mit ppL86mer dargestellt. Diese Interaktion von BiP mit den bereits translozierten Proteinen hat sich darüber hinaus als notwendig erwiesen, um die Proteine im Lumen festzuhalten, solange die Translokationspore noch nicht verschlossen ist (Trapping). Dadurch trägt BiP ebenfalls zur Translokationseffizienz bei. In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigen elektrophysiologische Untersuchungen, dass nach der Fertigstellung des Transports der Verschluss der Translokationspore nicht sofort erfolgt und dass BiP in Anwesenheit von ATP diesen Prozess beschleunigt (Wirth et al., 2003). Auch die Interaktion von weiteren Chaperonen mit den translozierten Polypeptiden würde zu dieser Retention der Proteine im Lumen des ER beitragen.

Nach der Translokation würde die Assoziation von BiP mit dem Translokon (nach Interaktion mit Sec63p) Konformationsänderungen verursachen, die zur Schließung der Pore führen und möglicherweise auch die Reassoziation des Sec62p/Sec63p-Komplexes mit dem Translokon induzieren würden. Das Translokon wäre nun wieder für kleine neutrale Moleküle durchlässig und würde durch eine instabile (Salz sensitive) Interaktion mit dem Ribosom assoziiert bleiben. In diesem Zustand wären Ribosom und Translokon für weitere Translokationszyklen bereit.

162



**Abb. 47 : Modell der Funktionen von BiP und Sec62p bei der cotranslationalen Translokation.** Zur Vereinfachung sind TRAMp, die Signalpeptidase und weitere translokonassoziierte Membranproteine nicht dargestellt. Das Verschließen des Translokons durch BiP wird hier als eine direkte Interaktion von BiP mit dem Sec61-Komplex dargestellt. In dieser Darstellung wird angenommen, dass das Translokon aus zwei Sec61-Komplexen besteht (**2x Sec61-K**). **PDI**: Proteindisulfidisomerasen. **Cyc**: Cyclophiline. Erläuterungen siehe Text.

# IV.2 Über die Untersuchungen zur Funktion des Säuger-Proteins Sec62p

An der Proteinbiogenese sind auf der cytosolischen Seite der ER-Membran neben der Translationsmaschinerie auch eine Vielzahl von cytosolischen (z.B. SRP, NAC) und Membran-Komponenten (z.B. SRP-Rezeptor, Sec61-Komplex, Mtj1p) beteiligt, die wahrscheinlich oder gesichert eine Funktion beim Transport von Proteinen in das ER-Lumen ausüben. Für alle erwähnten Proteine bzw. Komplexe ist eine Assoziation mit Ribosomen beschrieben worden (siehe 1.2.2 und 1.3.2). Ein hoch basisches Oligopeptid in der cytosolischen Domäne von Mtj1p und in SRP14 ist notwendig und ausreichend für ihre Assoziation mit Ribosomen. Sehr ähnliche Oligopeptid-Motive sind in mehreren der oben genannten ribosomenassoziierten Proteine/Komplexe und in einigen Translationsfaktoren zu finden (siehe Abb. 48).

Sec62p und Sec63p, die in Hefe essentiell für den posttranslationalen Proteintransport sind, wurden auch im Säuger identifiziert. Das Säuger Sec62p weist die höchste Sequenz-Homologie in den TM-Domänen und den flankierenden Regionen auf, doch in der cytosolischen N-terminalen Domäne (distal der Membran) befindet sich ein basisches Oligopeptid-Motiv (AA 4-10), das nur in dem Säuger-Protein vorkommt und das sehr ähnlich zu dem in Mtj1p oder SRP14 ist (siehe Abb. 1 und Abb. 48). Da im Säuger die meisten Proteine über den cotranslationalen Transportweg durch oder in die ER-Membran transloziert bzw. inseriert werden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Sequenzunterschiede in Sec62p evolutive Veränderungen darstellen, die ihm die Fähigkeit verleihen die Proteinsynthese bzw. den Proteintransport auf ribosomaler Ebene zu modulieren.

### IV.2.1 Sec62p interagiert mit Ribosomen

Die durch die Anwesenheit des Peptid-Motivs vorhergesagte Interaktion des Säugers Sec62p mit Ribosomen ist in der vorliegenden Arbeit durch Ribosomenbindungsversuche bestätigt worden. Hierbei handelt es sich um eine direkte Interaktion der cytosolischen N-terminalen Domäne (Sec62N) mit Ribosomen, die unabhängig von der C-terminalen Domäne geschieht. Klassische Ribosomenbindungsversuche wurden von Borgese et al. (Borgese *et al.*, 1974) bei einer Salzkonzentration von 25 mM durchgeführt. Proteine, die in einem geeigneten Puffer sonst löslich sind, pelletieren durch ein Saccharose-Kissen als Ergebnis ihrer Interaktion mit Ribosomen. Für den Sec61-Komplex wurde überdies gezeigt, dass diese Interaktion mit Ribosomen auch bei der physiologischen Salzkonzentration von 150 mM, bei der unspezifische Bindungen deutlich reduziert sind, bestehen bleibt (Kalies et al., 1994). Sec62N interagiert ebenfalls bei physiologischen Salz-Konzentrationen mit Ribosomen. Dass es sich hier um ein falsch positives Ergebnis handelte (aufgrund einer möglichen Ribosomen-induzierten Aggregation des Proteins) wurde mittels diskontinuierlicher Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ausgeschlossen. Das Fraktionierungsverhalten von Sec62N zeigte sich strikt Ribosomen-abhängig, was die Sec62N-Ribosomen-Interaktion bestätigt. Weitere Ribosomenassoziationsstudien unter steigenden Salz-Konzentrationen (bis 300 mM) offenbaren die Salzsensitivität der Bindung von Sec62N zu den Ribosomen und somit die elektrostatische Natur dieser Interaktion. In einer Kontrolluntersuchung wurde ausgeschlossen, dass die His<sub>6</sub>-Markierung im Sec62N durch Bindung an exponierte azidische Regionen in den Ribosomen an dieser elektrostatischen Interaktion beteiligt sein könnte. Die N-terminale Domäne von Sec62p ist daher per se verantwortlich für die Bindung an Ribosomen. So wurde die Bedeutung des hochgeladenen Peptids in Sec62N analysiert. Die Interaktionen von Sec62N∆N10, dem das basische Peptid fehlt, sowie von einem kürzeren Fragment, Sec62N98-180, wurden untersucht. Sec62N98-180 stellt einen Bereich von Sec62N mit einer wahrscheinlich  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur dar, der zahlreiche positive Ladungen enthält und wahrscheinlich an der Oberfläche in der gesamten Domäne lokalisiert ist (siehe Abb. 30). Daher war es denkbar, dass dieses Fragment an der elektrostatischen Interaktion mit den Ribosomen beteiligt sein könnte. Es ist hier zu bemerken, dass dieser Bereich ein geladenes Peptid enthält, das dem aminoterminalen basischen Peptidmotiv ähnelt (siehe Abb. 48). Sec62N98-180 zeigte jedoch keinerlei Interaktion mit Ribosomen, was darauf hindeutet, dass es für die Ribosomen-Interaktion nicht notwendig ist. Es kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass in der nativen Struktur der vollständigen Domäne diese Region und das darin enthaltenen basische Peptid so positioniert werden, dass sie an der Bindung zu den Ribosomen teilnehmen. Der Verlust des N-terminalen basischen Peptids bewirkt eine Reduktion der Interaktion der N-terminalen cytosolischen Domäne von Sec62p mit Ribosomen auf ca. ein Drittel, was zeigt, dass das basische Peptid tatsächlich wichtig für die Bindung der N-terminalen Domäne von

Sec62p mit Ribosomen ist, aber dass weitere Merkmale dieser Domäne benötigt werden, um die maximale Affinität zu erreichen. Diese Analyse lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Interaktion dieser Domäne von Sec62p mit nicht translatierenden Ribosomen um eine spezifische Interaktion handelt, wobei das aminoterminale basische Peptid eine bedeutende Rolle spielt.

		++++P+0+0
Mtj1p <i>, H.s.</i>	182-196	LLS <mark>RKKREKKKK</mark> TGS
Mtj1p, M.m.	178-192	LLG <mark>RKKR<b>E</b>RKKK</mark> TGS
Sec62p, H.s.	2-12	<b>AERRRHKKRIQE</b> V
Sec62p, M.m.	2-12	<b>AERRRHKKRIQE</b> V
Sec62p, H.s.	157-170	GTP <u>KKKE</u> T <u>KKK</u> FKL
Sec62p, M.m.	157-170	GTP <u>KKKE</u> T <u>KKK</u> FKL
NAC $\beta$ , H.s.	24-38	GTA <mark>RRKKKVVHR</mark> TAT
$NAC\beta$ , M.m.	24-38	<b>GTA<mark>RRKKK</mark>VVHR</b> TAT
SRP14, H.s.	91-105	MDGLKKRDKKNKTKK
SRP14, <i>M.m.</i>	91-105	MDGLKKRDKKNKSKK
eEF2, H.s.	836-850	<b>AETRKRK</b> GL <mark>KE</mark> GIPA
eEF2, M.m.	836-850	<b>AETRKRK</b> GL <mark>KE</mark> GIPA
eIF2β, <i>H.s.</i>	76-90	FNQ <u>KKKKKK</u> TKKIF <mark>D</mark>
eIF2β, M.m.	76-90	FNQ <u>KKKKKK</u> TKKIF <mark>D</mark>
eIF5B, <i>H.s.</i>	40-54	SKGKKKKEKKKQDFD
eIF5B, M.m.	40-54	SKGKKKKEKKKQDFD
eIF5B, <i>H.s.</i>	310-324	EGDKKKKDKKKKGE
eIF5B, M.m.	309-323	EGDKKKKDKKKKTE

#### Abb. 48 : Hochgeladene Peptide von verschiedenen ribosomassoziierten Proteinen

M.s.: Mus musculus, H.s.: Homo sapiens. Positiv geladene Aminosäurereste sind grün (K, R H), negativ geladene rot (E, D) dargestellt. Bei Mtj1p sind die für die Interaktion bzw. Translationshemmung ausreichenden AA eingerahmt. Überdies sind die positiven Ladungen als + dargestellt, P: geladene AA. Schwarze Hintergrund: für den Effekt wichtigste AA. Unterstrichen: für den Effekt weniger wichtige AA, 0: für den Effekt des Peptides unwichtige AA (Dudek et al., 2005).

Bei den Untersuchungen von Meyer et al. (2000) wurde Sec62p aus Hundepankreasmikrosomen (nach Solubilisierung der Membranen und Saccharose-Gradientenzentrifugation) in den ribosomenfreien Fraktionen vorgefunden. Darüber hinaus wurde durch Affinitätschromatographie eine Assoziation von Sec62p mit dem Sec61-Komplex detektiert, wobei es sich hier ebenfalls nur um ribosomenfreie Se61-Komplexe handelte. Diese Ergebnisse widersprechen der hier vorgestellten Sec62p-Ribosomen-Interaktion. Es ist jedoch zu beachten, dass die Untersuchungen von Meyer et al. unter Bedingungen durchgeführt wurden (verschiedene Detergenzien und 450 mM Salz), bei denen typische ribosomenassoziierte Proteine wie TRAPα und Mtj1p nur zur Hälfte oder gar nicht in den ribosomalen Fraktionen vorgefunden wurden (Meyer *et al.*, 2000; Dudek *et al.*, 2002). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass eine mögliche Interaktion von Sec62p mit Ribosomen durch die sehr stringenten Versuchsbedingungen gestört wurde.

In der Hefe enthält der cytosolische C-Terminus von Sec62p eine putative Effektordomäne, deren Deletion zu einem Verlust der Funktionalität des Proteins führt (Wittke et al., 2000) (siehe Abb. 1). Die hohe Sequenz-Homologie zwischen diesem und dem Säuger-Protein und die Tatsache, dass das Drosophila-Homolog das Hefe-Sec62p funktionell ersetzen kann und darüber hinaus eine noch höhere Sequenz-Homologie zum Säuger Sec62p aufweist (Noel und Cartwright, 1994), deutet daraufhin, dass der C-Terminus auch im Säuger-Protein für seine Funktion notwendig ist. Ob der C-Terminus des Säuger-Sec62p eine modulierende Funktion durch Einfluss auf die Interaktion des N-Terminus mit Ribosomen hat, wurde hier in einem Ribosomenbindungsversuch analysiert. Eine Interaktion von N- und C-Terminus miteinander wurde durch einen pull-down-Versuch ausgeschlossen. Der C-Terminus wurde als GST-Fusionsprotein synthetisiert, dabei nahm das GST seine native Konformation an. Es ist daher anzunehmen, dass sich der Sec62p-Anteil des Fusionsproteins ebenfalls in seiner nativen Konformation befand. Die Ribosomenbindungsversuche zeigen, dass der cytosolische C-Terminus mit den Ribosomen nicht interagiert, und dass er die Sec62N-Ribosomen Interaktion nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass in Sec62p die cytosolische N-terminale Domäne allein für die Interaktion mit Ribosomen verantwortlich ist, und dass im Fall einer Funktion des C-Terminus diese Funktion wahrscheinlich unabhängig von einer direkten Interaktion mit Ribosomen erfolgt.

### IV.2.2 Sec62p teilt die selbe Bindungsstelle mit Mtj1p am ribosomalen Tunnelausgang

Die Säugerproteine Sec62p und Sec63p interagieren miteinander (Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000). Zwischen diesem Sec62/63-Komplex und Mtj1p gibt es einige Analogien. So handelt es sich um ER-Membranproteine und Mtj1p und Sec63p haben jeweils eine J-Domäne und interagieren dadurch mit BiP als Hsp40-Cochaperone. Darüber hinaus enthält Mtj1p in seiner cytosolischen Domäne einen Sequenzbereich mit Homologie zu Sec63p (Chevalier et al., 2000; Dudek, 2002). Nun wurde gezeigt, dass sowohl Sec62p als auch Mtj1p mit Ribosomen interagieren, wofür ein basisches Peptidmotiv wesentlich ist. Weiter können beide Proteine durch diese Interaktion die Translation hemmen (siehe IV.2.3). Um zu untersuchen ob, die N-terminale cytosolische Domäne von Sec62p und der C-Terminus von Mtj1p eine gemeinsame Bindungsstelle am Ribosom haben, wurden Ribosomenassoziationsstudien unter Kompetitions- und Verdrängungsbedingungen durchgeführt (III.2.2.1). Die Kompetitionsversuche zeigen, dass die Interaktion eines der Proteine mit den Ribosomen die Bindung des anderen ausschließt und die Verdrängungsversuche zeigen, dass die beiden Proteine dieselbe oder überlappende Bindungsstellen am Ribosom haben. Da die Stöchiometrie der Bindung von Sec62p zu den Ribosomen nicht bekannt ist, kann man keinen Schluss über die Affinität von Sec62p und Mtj1p für die Bindungsstelle am Ribosom ziehen. Durch Kryo-EM wurden die ribosomalen Kontaktstellen von Mtj1p in einem Bereich am Tunnelausgang lokalisiert. Diese involvieren Kontaktstellen, die auch von SRP und dem Sec61-Komplex verwendet werden (Blau et al., 2005). So muss auch Sec62N mit diesem Bereich des Ribosoms interagieren. Weitere Untersuchungen deuten ebenfalls auf eine Lokalisierung der Bindungsstelle von Sec62N am Tunnelausgang hin: Die Interaktion von Sec62N mit Ribosomen bewirkt eine Translationshemmung (siehe IV.2.3), die in Anwesenheit von Mikrosomen (bei der Synthese eines sekretorischen Proteins) teilweise aufgehoben wird (III.2.3.6). Diese Aufhebung tritt bei der Synthese eines nicht sekretorischen Proteins nicht ein (III.2.3.7). Dies zeigt, dass nach der Interaktion der translatierenden Ribosomen mit dem Translokon, das am ribosomalen Tunnelausgang bindet, die Bindungsstelle für Sec62N nicht mehr exponiert wird. Dies zeigt wieder, dass auch Sec62N an diesem Bereich des Ribosoms bindet. Quervernetzungsexperimente bestätigen die Lokalisierung der Bindungsstelle von Sec62N am Tunnelausgang. In diesen Analysen wurden translatierende Ribosomen mit Sec62N inkubiert und eine Quervernetzung zwischen Sec62N und der naszierenden Kette beobachtet (Anika Müller, persönliche Mitteilung). Diese Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass Sec62N auch an translatierende Ribosomen binden kann, aber dann die Translation nicht hemmt. Der gemeinsame Effekt, Translationshemmung, eine gemeinsame Bindungsstelle am Ribosom und wahrscheinlich ähnliche Regulationsmechanismen (siehe IV.2.5) deuten darauf hin, dass Sec62p und Mtj1p Alternativen für eine Funktion im ER darstellen.

Desweiteren wurde die Kompetition von Sec62N mit SRP14 (III.2.2.2) und von Mtj1p mit SRP14 (III.2.2.3) untersucht. Die Bindungsstelle von SRP14 ist bekannt. Sie liegt an der katalytischen Grenzfläche zwischen der großen und kleinen Untereinheit. Die Kompetitionsstudien zeigen, dass Sec62N und Mtj1p um die Bindungsstelle von SRP14 nicht kompetieren und daher eine andere Bindungsstelle am Ribosom als SRP14 besitzen. Hohe Konzentrationen an SRP14 bewirkten eine Reduktion der Interaktion von Mtj1p um 30 %. Die ribosomale Bindungsstelle von Mtj1p und Sec62p am Tunnelausgang ist sehr exponiert und wird von mehreren ribosomenassoziierten Proteinen (SRP54, Sec61a) verwendet. Es ist daher möglich, dass durch die gemeinsamen basischen Motive SRP14 teilweise an dieser Stelle unspezifisch bindet. Dass SRP14 Mtj1p, aber nicht Sec62N von seiner Bindungsstelle am Ribosom verdrängen kann, deutet auf eine höhere Affinität von Sec62p als Mtj1p um die Bindungsstelle am Ribosom hin. In der Natur wird die Interaktion der Proteine mit den Ribosomen nicht nur durch ihre bestimmten Bindungsmotive und ihre Struktur, sondern auch durch ihre Lokalisierung bestimmt. So kann SRP14 schon durch seine Position im SRP-Komplex nur an einer bestimmten Stelle des Ribosoms binden. Genau so limitiert die Verankerung an der Membran die Bindung von Mtj1p und Sec62p auf den ribosomalen Tunnelsausgangsbereich.

### IV.2.3 Sec62p moduliert die Translation

Die biologische Relevanz der Sec62p-Ribosomen-Interaktion wurde im zellfreien Translationssystem untersucht (III.2.3). Dabei wurde der Einfluss von Sec62p auf die Translation beobachtet. Die rekombinant hergestellte cytosolische N-terminale Domäne von Sec62p, Sec62N, wurde *in vitro*-Translationsansätzen zugesetzt. Die gewonnenen Daten zeigen, dass Sec62N eine konzentrationsabhängige Inhibition der Synthese von Präprolaktin in Kaninchen-Retikulozytenlysat bewirkt, wobei die Konzentration an Ribosomen ebenfalls limitierend ist. Auch die Translation von Luciferase wurde durch Sec62N inhibiert. Demnach wird die Synthese sowohl sekretorischer als auch nichtsekretorischer Modell-Proteine durch Sec62N auf ribosomaler Ebene gehemmt. Kontrollexperimente zeigen, dass die verminderte Menge an Translationsprodukt nicht auf eine proteolytische Aktivität der Sec62N-Präparation oder auf die C-terminale His<sub>6</sub>-Markierung des rekombinanten Proteins zurückzuführen ist. Die Stärke der Inhibition korreliert mit der Fähigkeit, mit Ribosomen zu interagieren. So hemmt das an dem aminoterminalen basischen Peptid deletierte Sec62NAN10 entsprechend seiner verminderten Bindung an Ribosomen auch die Translation weniger. Das Fragment Sec62N98-180, welches nicht in der Lage ist, mit Ribosomen zu interagieren, ruft keine Translationshemmung hervor. Daraus kann gefolgert werden, dass Sec62N die Proteinsynthese durch eine spezifische Interaktion mit Ribosomen inhibiert. Dafür ist das basische Peptid wichtig, doch zusätzliche Bereiche der cytosolischen Domäne scheinen diese Bindung und die dadurch vermittelte Translationshemmung effizienter zu machen. Durch weitere in vitro-Translationsstudien wurde gezeigt, dass die C-terminale cytosolische Domäne von Sec62p keinen Effekt auf die Translation ausübt und auch die Hemmung der Translation, die von Sec62N bewirkt wird, nicht beeinflusst. Da die Interaktion mit Ribosomen Voraussetzung ist, um einen Effekt auf die Translation auszuüben, stimmt dies mit den Ergebnissen der Ribosomenassoziationsstudien überein.

Es wurde weiter untersucht, welche Ebene der Translation Sec62N beeinflusst. Sec62N hemmt die Translation, wenn Initiation und Elongation möglich sind. Um zu unterscheiden, ob Sec62N die Initiation oder die Elongation der Translation hemmt, wurde in einem Translationsansatz die Initiation der Translation ausgeschaltet. In diesem Translationsansatz, in dem nun nur die Elongation von bereits initialisierten Polypeptidketten möglich war, bewirkte Sec62N keine Translationshemmung. Sec62N inhibiert daher nicht die Elongation, sondern die Initiation der Translation (III.2.3.4). Solche Inhibition kann aufgrund der Lokalisierung von Sec62N am Tunnelausgang nur über allosterische Effekte erklärt werden. In diesem Modell würde die Interaktion von Sec62p eine Konformationsänderung im Bereich der Untereinheitengrenzfläche bewirken und dort die Translationsinitiation verhindern. Kürzlich ist durch Kryo-EM-Aufnahmen für Mtj1p gezeigt worden, dass seine Interaktion mit 80S Ribosomen bestimmte, sonst flexible ribosomale Strukturen fixiert (Blau *et al.*,
2005). Eine dieser Strukturen ist das "Expansion Segment 27" (ES27), das an der ribosomalen Grenzfläche entsteht und bis in die Region des Tunnelausgangs entlang der großen Untereinheit verläuft (Beckmann et al., 2001). Es ist daher denkbar, dass die modulierende Interaktion von Proteinen wie Mtj1p oder Sec62p von der Membran bis in die Untereinheitengrenzfläche über das ES27 kommuniziert wird. Mtj1p konnte in einem Proteoliposomen-System rekonstituiert werden und als membranverankertes Protein die Translation hemmen (Anika Müller, persönliche Mitteilung). Dies unterstützt ebenfalls das Modell eines allosterischen Wirkungsmechanismus von Mtj1p für den Effekt auf die Translation. Die Ribosomenbindungsstudien für Sec62N zeigen, dass die Bindung des Proteins an die Ribosomen die Verdrängung des Elongationsfaktors 2 (eEF2) von seiner Bindungsstelle am Ribosom bewirkt (III.2.1.1; III.2.1.2). Sowohl die Elongationsfaktoren als auch die Initiationsfaktoren interagieren mit einem engen Bereich an der ribosomalen Untereinheitengrenzfläche und viele teilen die selben ribosomalen Kontaktstellen (Choi et al., 2000; Gomez-Lorenzo et al., 2000; Carter et al., 2001; Wilson et al., 2002; Lomakin et al., 2003; Blanchard et al., 2004; Halic et al., 2004; Spahn et al., 2004; Allen et al., 2005). Bei den Ribosomen, die in den Ribosomenbindungsstudien eingesetzten werden, handelt es sich allerdings um nicht translatierende 80S Ribosomen, die sich in einen inaktiven Zustand ohne naszierende Kette befinden. Die Verdrängung des eEF2 von diesen Ribosomen legt die Vermutung nahe, dass die Interaktion von Sec62N am ribosomalen Tunnelausgang ebenfalls eine Konformationsänderung an der Translationsfaktoren-Bindungsstelle bewirkt. Die elektrostatische, instabile Interaktion des eEF2 mit diesen nicht translatierenden Ribosomen spiegelt die Fähigkeit dieses Faktors wider, schnell mit bzw. von Ribosomen assoziieren und dissoziieren zu können, was für die korrekte Ausübung seiner Funktion notwendig ist. In vivo würden die Ribosomen nach Initiation der Translation wahrscheinlich eine Konformation annehmen, bei der die Interaktion von Sec62p den allosterischen Effekt nicht mehr bewirken kann. Folgende Beobachtungen unterstützen diese Hypothese. a) Der Durchgang der naszierenden Kette durch den ribosomalen Ausgangstunnel verursacht Konformationsänderungen im Ribosom (Woolhead et al., 2004). b) Mittels Kryo-Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass in nicht transltierenden Ribosomen das ES27 zwischen dem Tunnelasugang und einer Position davon entfernt pendelt. Dagegen kommt es bei translatierenden Ribosomen zur Stabilisierung des ES27 in der letzteren Position (Beckmann et al., 2001). In dieser Konformation wäre das ES27 für Proteine wie Sec62p, die am ribosomalen Tunnelausgang binden, nicht mehr erreichbar.

### IV.2.4 Effekt von Sec62p auf die cotranslationale Translokation

Sec62p ist für den posttranslationalen Transport in der Hefe ein essentielles Protein und einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass dieses Protein auch im Säuger an dem Proteintransport beteiligt ist (siehe I.3.1). Im Säuger ist der Haupt-Mechanismus zum Proteintransport der cotranslationale. Bei diesem Mechanismus werden Ribosomen, die sekretorische Proteine synthetisieren, durch Interaktion mit SRP zur ER-Membran geleitet. Die erste Interaktion mit der Membran erfolgt durch den SRP-Rezeptor, anschließend werden die Ribosomen zum Translokon übergeben, wo die weitere Synthese und der gleichzeitige Transport des Proteins erfolgen (siehe I.3.2). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Sec62p durch seine N-cytosolische Domäne mit Ribosomen interagiert und dadurch die Translation hemmt. Ob Sec62p ebenfalls durch Interaktion mit Ribosomen an der cotranslationalen Translokation beteiligt ist, wurde durch einen in vitro-Translationsversuch in Anwesenheit von Mikrosomen getestet. Bei einer Funktion des mikrosomalen Sec62p am Translokationsprozess würde eine Kompetition mit zugesetzter, N-cytosolischer Domäne von Sec62p zu einer verminderten Translokation führen (III.2.3.6). Es wurde keine Kompetition beobachtet und so konnte eine Funktion von Sec62p bei der cotranslationalen Translokation nicht bestätigt werden. Folgende Situation könnte zu diesem negativen Ergebnis geführt haben: Es ist wahrscheinlich, dass SRP und Sec62p überlappende Bindungsstellen am Ribosom haben, denn SRP bindet auch am ribosomalen Tunnelausgangsbereich und teilt hier einige Kontaktstellen mit Sec61a (siehe I.3.2). Nach Interaktion des Ribosom-naszierende Kette-SRP-Komplexes mit dem SRP-Rezeptor wäre eine Übergabe des Ribosoms vom SRP zum mikrosomalen Sec62p durch die räumliche Nähe sehr effizient, was eine mögliche Interaktion mit dem zugegebenen Kompetitor ausschließen würde.

Um den cotranslationalen Transport zu untersuchen, wurden Analysen durchgeführt, bei denen Vesikel, die mit den Komponenten des Translokons rekonstituiert waren, eingesetzt wurden (Nicchitta und Blobel, 1990; Görlich und Rapoport, 1993; Neuhof *et al.*, 1998). Die Funktion von Sec62p in diesem Prozess und die Bedeutung des N-terminalen Peptidmotivs könnten direkt unter der Anwendung dieser Technik untersucht werden. Dafür müssten verschiedene rekombinant hergestellte Sec62p-Fragmente in solchen Vesikeln neben den restlichen Komponenten des Translokons rekonstituiert werden und der mögliche Effekt der Deletionen in Sec62p auf die Translokation analysiert werden.

## IV.2.5 Modell zur Funktion von Sec62p des Säugers

Die cytosolische Domäne von Sec62p vermittelt eine Interaktion mit Ribosomen, die eine Inhibition der Translation auf Ebene der Initiation zur Folge hat. Dies lässt den Schluss zu, dass Sec62p an der Proteinbiogenese beteiligt ist. An der Membran des endoplasmatischen Retikulums ist diese eng mit der cotranslationalen Translokation von Proteinen durch oder Integration in die Membran verbunden. Diese Prozesse erfolgen an der ER-Membran durch das Translokon, einen proteinführenden Kanal, der aus einer Reihe von Membranproteinen gebildet wird. Darin stellt der Sec61-Komplex die zentrale Komponente dar, denn als Dimer bildet er die Pore des Translokons (Görlich und Rapoport, 1993; Mitra et al., 2005). Die Synthese eines sekretorischen Proteins kann an frei im Cytosol vorliegenden oder an bereits an das Translokon assoziierten Ribosomen beginnen (Potter und Nicchitta, 2000). Im ersten Fall werden die Ribosom-naszierende Ketten-Komplexe durch Interaktion mit SRP zur ER-Membran geleitet, wo die Interaktion mit dem Translokon erfolgt (siehe I.3.2). Für die Verankerung der Ribosomen während der cotranslationalen Translokation aber auch an diese anschließend sind die Sec61-Komplexe im Translokon verantwortlich (Kalies et al., 1994; Snapp et al., 2004; Mitra et al., 2005). Die Stabilität der Interaktion des Ribosoms mit dem Translokon variiert in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit einer naszierenden Kette. Während der cotranslationalen Translokation eines Proteins (ab einer Länge von ~ 70 AA) ist diese Interaktion stabil und die Translokationspore ist für den Durchgang der naszierenden Kette offen (siehe I.3.2). Nach Beendigung der Translation bleiben sowohl die Assoziation des nun wieder geschlossenen Translokons als auch die Interaktion mit dem Ribosom bestehen, wobei beim Verschließen des Translokons Konformationsänderungen erfolgen, die die Interaktion mit dem Ribosom instabil machen. In diesem Zustand ist das Ribosom bereit, eine neue Synthese einzugehen. Dabei kann die Synthese sowohl eines sekretorischen als auch eines nichtsekretorischen Proteins initiert werden.

# IV.2.5.1 Sec62p als Anker und Modulator von nicht-translatierenden Ribosomen an der ER-Membran

Der Sec61-Komplex ist der Hauptanker des Ribosoms am Translokon, aber die Größe des Ribosoms und der Unterschied in der Affinität zu Ribosomen zwischen

mit gereinigten Sec61-Komplexen rekonstituierten Membranvesikeln und aus nativen Membranen hergestellten Proteoliposomen lassen die Möglichkeit offen, dass neben dem Sec61-Komplex auch andere Membranproteine gleichzeitig mit dem Ribosom assoziiert vorliegen und dabei dessen Aktivität regulieren. Der Befund, dass Sec62p und Sec61a in äquimolaren Konzentrationen in Hundepankreasmikrosomen vorliegen (Tyedmers et al., 2000) und dass sie miteinander interagieren (Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000) deutet daraufhin, dass Sec62p wahrscheinlich ein Translokon assoziiertes Protein ist. In den hier vorgestellten Daten wird gezeigt, dass Sec62p mit Ribosomen interagiert und deren Aktivität reguliert, wobei es sich hier um eine Inhibition der Translation auf Ebene der Initiation handelt. Es ist daher vorstellbar, dass Sec62p neben dem Sec61-Komplex zu der Assoziation von nicht-translatierenden Ribosomen mit der ER-Membran beiträgt und darüber hinaus ihre Funktion reguliert. Sec62p bindet an dem ribosomalen Tunnelausgang wahrscheinlich an ribosomalen Kontaktstellen, die auch von Sec61a verwendet werden (siehe IV.2.2). Bei der instabilen Interaktion des Sec61-Komplexes mit dem nicht translatierenden Ribosom würde der Komplex nicht alle Kontaktstellen verwenden, so dass eine Interaktion mit Sec62p möglich wäre. Im Fall der Synthese eines sekretorischen Proteins, aber erst nach der Erkennung der SS durch das Translokon, würde der Sec61-Komplex alle Kontaktstellen (einschließlich die von Sec62p verwendet) für die stabile Interaktion mit dem Ribosom benötigen und dadurch würde die Interaktion mit Sec62p entfallen. Bei der Synthese eines nicht-sekretorischen Proteins gelangt dieses nach fehlender SS-Erkennung aus der Translokationspore ins Cytosol. Zu diesem Zeitpunkt könnte das cytosolische NAC, das mit hoher Affinität an alle naszierenden Ketten, jedoch nicht an SS bindet (Möller et al., 1998) (siehe I.3.2), die naszierende Ketten erkennen und anschließend an seiner Bindungsstelle am ribosomalen Tunnelausgang binden. NAC enthält auch ein basisches Peptidmotiv (siehe Abb. 48) und könnte daher Sec62p verdrängen, so könnte NAC die instabile Interaktion des Ribosoms mit dem Translokon destabilisieren und somit dessen Freisetzung in den cytosolischen Pool erlauben. Die Assoziation von Sec62p mit den nicht translatierenden Ribosomen würde ein Kontrollpunkt darstellen, der bei bestimmten Situationen die Initiation der Translation eines Proteins verhindern würde. Ein weiterer Kandidat um diese Funktion auszuüben wäre das Membran-Hsp40-Chaperon Mtj1p. Es kann ebenfalls mit Ribosomen interagieren und die Initiation der Translation hemmen (Dudek et al., 2005). Für Mtj1p wurde eine Konzentration in mikrosomalen Membranen von 0,36 µM festgestellt (Dudek, 2002). Bei einer Sec61α-Konzentration von 2,12 µM (Tyedmers et al., 2000), und unter der Berücksichtigung, dass ein Translokon wahrscheinlich zwei Sec61-Komplexe enthält, bedeutet dies, dass nur jedes dritte Translokon ein Mtj1p zur Verfügung hätte. Da Sec62p in äguimolarem Verhältnis zu Sec61α steht, ist es ein wahrscheinlicher Bindungspartner, um diese Funktion zu übernehmen. Jeder Sec61-Komplex könnte einen cotranslationalen Translokationszyklus eingehen und dadurch anschließend mit dem Ribosom assoziiert bleiben. Da für jedes Sec61α ein Sec62p verfügbar ist, würde dies sicherstellen, dass jedes translokonassoziierte Ribosom reguliert wäre. Die modulierende Funktion von Sec62p wird wahrscheinlich durch Interaktion mit Sec63p kontrolliert. Sec63p kommt in äquimolarer Konzentration mit Sec62p vor und besitzt eine J-Domäne, wodurch es als Hsp40-Cochaperon von BiP agiert. Eine Regulation dieser Art würde eine Kommunikation zwischen ER-Lumen und Cytosol bzw. Ribosom darstellen. Für Mtj1p, welches selber eine J-Domäne besitzt, ist gezeigt worden, dass die Interaktion mit BiP durch die J-Domäne zu einer inaktiven Bindung mit den Ribosomen führt, d.h. die Interaktion der cytosolischen Domäne von Mtj1p mit den Ribosomen verursacht keine Translationshemmung, wenn BiP mit dem Protein interagiert (Dudek et al., 2005). Die Interaktion von BiP mit der luminalen Seite von Mtj1p erfolgt wahrscheinlich durch die Substratbindungsdomäne von BiP (Johanna Dudek, persönliche Mitteilung). Aufgrund der Analogien zwischen Mtj1p und Sec62p und Sec63p als Komplex ist es denkbar, dass die Interaktion von BiP mit Sec63p sich in ähnlicher Weise auf Sec62p auswirkt. So würde die Interaktion von BiP mit der J-Domäne von Sec63p dazu führen, dass Sec62p mit den Ribosomen interagiert, ohne dass es zur Translationshemmung kommt. Die Bindung von BiP mit Sec63p für diese Regulation würde ebenfalls durch die Substratbindungsdomäne von BiP stattfinden. Dies wäre möglich, denn Sec63p besitzt eine hydrophobe Sequenz, die für eine solche Interaktion mit BiP geeignet wäre.



**Abb. 49 : Modell der Interaktion von Sec62p mit dem Ribosom und seine Regulation durch BiP.** Zur Vereinfachung sind TRAMp, die Signalpeptidase und weitere translokonassoziierte Membranproteine nicht dargestellt, ebenfalls sind pro Translokon nur je ein Sec62p und Sec63p dargestellt. In dieser Darstellung wird angenommen, dass das Translokon aus zwei Sec61-Komplexen besteht (2x Sec61-K).

#### IV.2.5.2 Sec62p bei der Qualitätskontrolle

In das ER wird ein Teil der Sec61-Kanäle parallel zum cotranslationalen Transportweg für den Export von Proteinen verwendet. Irreversibel fehlgefaltete Proteine werden durch die Qualitätskontroll-Maschinerie im ER erkannt und ins Cytosol retransloziert, wo sie ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert werden. Dieser Prozess der ER-assoziierten Degradation, ERAD, kann nur dann effizient gewährleistet werden, wenn der Signaltransduktionsweg UPR intakt ist (Kabani et al., 2003). Die Aktivierung der UPR führt einerseits zur Induktion der Transkription von ER-Chaperon-Genen im Zellkern und andererseits zur Erniedrigung der Syntheserate von anderen, nicht UPR-induzierten Proteinen im Cytosol, wobei die Proteinsynthese durch die Ribosomen an der ER-Membran erhalten bleibt (Stephens et al., 2005). In Hefe- und Säugerzellen sind ebenfalls der Sec61-Kanal und eine ganze Reihe von ER-Chaperonen in die Retrotranslokation von ERAD-Substraten involviert (siehe I.2.1.1). Der Prozess des Andockens eines Substrats an das Translokon wie auch die Erkennung der Polypeptidkette als Exportsubstrat sind noch unbekannt. Es wurde ein Qualitätskontroll-Subkompartiment im ER beschrieben, welches für die Konzentrierung und Retrotranslokation von bestimmten Exportsubstraten (Glykoproteinen) verantwortlich sein soll und möglicherweise einen Pool von rein exportierenden Translokons enthält (Kamhi-Nesher et al., 2001). Das Translokon erlaubt jedoch die Bewegung eines Transport-Substrats in beide Richtungen (Ooi und Weiss, 1992; Matlack et al., 1999), dadurch besteht auch die Möglichkeit, dass ein Sec61-Kanal sowohl den Import als auch den Export von Proteinen ausführt. Dabei sollte jedoch gewährleistet werden, dass der Retrotransport nicht mit dem Import interferiert, was einen Informationsaustausch zwischen beiden Seiten der ER-Membran erfordert. Der Sec62/63-Komplex könnte an der Übertragung der Information aus dem ER-Lumen zum Cytosol beteiligt sein. Durch die vorläufige Inhibition der Initiation eines neuen Proteins würde das Translokon frei gehalten, um den ungehinderten Durchtritt eines zu exportierenden Substrats zu erlauben. Die Sec62p-vermittelte Translokationshemmung könnte auf der luminalen Seite durch eine Verringerung der Menge an verfügbarem BiP (dem Bindungspartner der J-Domäne von Sec63p) ausgelöst werden. Bei der Induktion der UPR wurde ein ähnlicher Mechanismus beobachtet. Die Schlüsselkomponenten der UPR in der ER-Membran, PERK, Ire1 $\alpha$ , Ire1 $\beta$  und ATF6, bilden in ungestressten Zellen stabile Komplexe mit BiP, die bei einer Anhäufung von ungefalteten Proteinen durch den höheren Bedarf an BiP auseinander gehen. Dies führt zur Aktivierung dieser Proteine und somit zur Induktion der UPR (Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000; Shen et al., 2002a; Kimata et al., 2003; Rutkowski und Kaufman, 2004) (siehe I.2.1.1). Bei ATF6 folgt nach dem Ablösen von BiP sein Transport zum Golgi-Apparat, wo es durch Proteolyse aktiviert wird. Die Aktivierung von ATF6, Ire1a und Ire1ß resultiert in einem Anstieg der Transkriptionsrate von Genen ERresidenter Proteine, die an der Proteinfaltung beteiligt sind (Fewell et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Calfon et al., 2002; Dalbey und von Heijne, 2002; Lee et al., 2002; Rutkowski und Kaufman, 2004). Ire1β und PERK bewirken auf ribosomaler Ebene durch jeweils Abspaltung der 28S rRNA und Phosphorylierung des elF2α eine Hemmung der allgemeinen Translationsinitiation (Harding et al., 1999; Mori, 2000; Iwawaki et al., 2001). Wegen charakteristischer Merkmale in seiner cytosolischen Domäne wurde für Mtj1p eine Funktion als Transkriptionsfaktor vorhergesagt, die nach intramembranärer Proteolyse induziert wird. Kürzlich wurde gezeigt, dass in vivo die cytosolische Domäne von Mtj1p tatsächlich mit Importin  $\beta$ , einem Kern-Import-Faktor, interagiert und in dem Kern transportiert wird (Dudek et al., 2005). Dadurch, dass Mtj1p mit hoher Affinität durch seine J-Domäne mit BiP interagiert, könnte ein analoger Mechanismus wie bei ATF6 dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor induzieren. Wenn bei einer Stress-

Situation im ER das Niveau an ungefalteten Proteinen zu steigen anfängt und BiP stärker an dieser Stelle beansprucht wird, reduziert sich demzufolge die Konzentration des Chaperons an der Membran. Regulatorische Cochaperone, die eine niedrige Affinität für BiP haben, nehmen als erstes diese Reduktion in der Konzentration von BiP wahr, so wird Sec63p, dessen Affinität zu BiP ( $K_D = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) niedriger ist als die von Mtj1p ( $K_D = 0,12 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) (Tyedmers *et al.*, 2000; Dudek, 2002), an erster Stelle eine Anhäufung ungefalteter Proteine bemerken und eine Reaktion dagegen starten. Die nun fehlende Interaktion von BiP mit Sec63p würde durch Sec62p zur Inhibition neuer Proteinsynthesen an membranassoziierten Ribosomen führen und könnte den Anfang eine Serie von Ereignissen darstellen, die zur Dissoziation der kleinen ribosomalen Untereinheit und der mRNA führen würde. Eine weitere Reduzierung an verfügbarem BiP würde die Aktivierung von (Transkriptions)-Faktoren wie Mtj1p als Folge haben. Die nach Induktion durch UPR-Transkriptionsfaktoren transkribierte mRNA könnte in Initiationskomplexe eingebaut werden und aufgrund der frühzeitigen Intervention von Sec62p mit den nun bereits translokonassoziierten großen ribosomalen Untereinheiten interagieren. Im ER-Lumen gibt es neben dem aktiven auch einen Reservepool von inaktivem BiP (Gething, 1999). So existient BiP in vivo in einem Aquilibrium zwischen einer aktiven unmodifizierten, monomeren Form (Hendershot et al., 1988; Freiden et al., 1992) und einer Form als inaktives modifiziertes (Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung) Oligomer (Carlsson und Lazarides, 1983; Welch et al., 1983; Leno und Ledford, 1990; Leustek et al., 1991; Blond-Elguindi et al., 1993b; Ledford und Leno, 1994; Gaut, 1997). Unter Bedingungen, die zur Anhäufung ungefalteter Peptide führen, wird der Modifizierungsgrad von BiP reduziert und der Anteil an monomerem BiP erhöht (Carlsson und Lazarides, 1983; Hendershot et al., 1988; Leno und Ledford, 1990; Leustek et al., 1991; Freiden et al., 1992; Laitusis et al., 1999). Parallel zur Transkriptionsinduktion im Kern würde im ER-Lumen aus der BiP-Reserve wieder aktives BiP generiert, so dass die Initiationshemmung durch Sec62p nach Interaktion von BiP mit Sec63p aufgehoben würde. So könnten die Ribosomen die Translation der zur Bekämpfung der Stress-Situation benötigten Proteine starten und gleichzeitig deren Translokation beginnen. Wie jedoch diese Ribosomen der durch Ire1β und PERK induzierten generellen Hemmung der Translationsinitiation entgehen, ist noch unbekannt. Die Effizienz der Translokation der Faltungsmaschinerie-Komponenten wird durch die Lokalisierung der Ribosomen bereits an der ER-Membran erhöht (Potter et al., 2001).



#### Abb. 50 : Modell der Funktion von Sec62p bei der UPR

Zur Vereinfachung sind TRAMp, die Signalpeptidase und weitere translokonassoziierte Membranproteine nicht dargestellt, ebenfalls sind pro Translokon nur je ein Sec62p und Sec63p dargestellt. In dieser Darstellung wird angenommen, dass das Translokon aus zwei Sec61-Komplexen besteht (**2x Sec61-K**). **PDI**: Proteindisulfidisomerasen, **Lek**: Lektine. Das Verschließen des Translokons durch BiP wird hier als eine direkte Interaktion von BiP mit dem Sec61-Komplex dargestellt. Erläuterungen siehe Text.

# IV.2.5.3 Sec62p bei der Translokation bzw. Insertion von Proteinen durch bzw. in die ER-Membran

In der Hefe ist Sec62p ein essentieller Teil des Signalsequenzrezeptors im Translokon, der das Targeting von posttranslational zu translozierenden Substraten erlaubt. Die Erkennung des zu transportierenden Substrats führt zu Konformationsänderungen des Translokons, die die Öffnung der Pore als Folge haben. Das Säuger Sec62p wurde neben Sec61α zu einem posttranslational zu translozierenden Substrat quervernetzt und das *Drosophila*-Homologe kann Sec62p in der Hefe funktionell ersetzen. Dies erlaubt die Vermutung, dass das Säuger-Sec62p am posttranslationalen Proteintransport beteiligt ist (siehe I.3.1). Im Säuger ist jedoch der cotranslationale der Haupt-Transportmechanismus, um Proteine in oder durch die ER-Membran zu translozieren. Da das Säuger-Sec62p in äquimolarem Verhältnis zu Sec61α vorkommt, wäre es denkbar, dass es ebenfalls an dem cotranslationalen Transport beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde jedoch kein Effekt auf den cotranslationalen Transport eines Substrats beobachtet, wenn die mikrosomalen Membranen in Anwesenheit eines möglichen Kompetitors für das endogene Sec62p inkubiert wurden. Eine Beteiligung von Sec62p an der Translokation konnte aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden (siehe IV.2.4). Die Tatsache, dass der cotranslationale Transport in Membranvesikeln, die nur mit den Sec61-Komplex und TRAMp enthielten, ohne die maximale Effizienz rekonstituiert werden konnte, deutet daraufhin, dass weitere Komponenten dafür notwendig sind (Görlich und Rapoport, 1993). Darüberhinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Sec62p mit Ribosomen interagiert und dadurch die Translation reguliert. Proteinsynthese an ERmembranassoziierten Ribosomen und Translokation bzw. Insertion von Proteinen durch bzw. in die ER-Membran sind aneinander angeschlossene Prozesse. Somit scheint es sehr wahrscheinlich, dass Sec62p durch seine Interaktion mit Ribosomen eine regulatorische Funktion bei der Translokation ausübt.

Der Transport von Proteinen durch oder in die ER-Membran erfordert eine enge Kommunikation zwischen der cytosolischen und der luminalen Seite des Translokons. So muss in frühen Stadien der Translokation die Interaktion des Ribosoms mit dem Translokon auf der cytosolischen Seite und die Öffnung des Translokons auf der luminalen Seite koordiniert werden. Auch während der Insertion eines Membranproteins müssen Veränderungen im Ribosom, die durch den Durchgang der naszierenden Kette und ihrer verschiedenen Domänen (TM-Domänen, luminale und cytosolische Domänen) verursacht werden, bis zur luminalen Seite kommuniziert werden (Liao et al., 1997; Woolhead et al., 2004). Während dieser Prozesse verschließt das Hsp70-Chaperon BiP die Translokationspore von der luminalen Seite (Hamman et al., 1998; Haigh und Johnson, 2002; Alder et al., 2005). Sec63p wurde als Hsp40-Interaktionspartner für diese Funktion von BiP vorgeschlagen (Alder et al., 2005) (siehe IV.1.2). Auf der luminalen Seite des Translokons werden ebenfalls ATP-bindende Proteine, wahrscheinlich BiP und/oder Grp170, benötigt, damit die Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon auf der cytosolischen Seite stattfindet. Um diese Funktion auszuüben, wurde eine Interaktion mit Sec63p vorgeschlagen (Klappa et al., 1991; Zimmermann et al., 1991; Dierks et al., 1996). Eine direkte Rolle von Sec63p beim cotranslationalen Transport in der Hefe wurde durch Mutationsversuche gezeigt. Dabei sind sowohl die J-Domäne als auch die cytosolische Domäne notwendig. So wurde vorgeschlagen, dass eine Interaktion dieser Domäne mit dem Ribosom zur Öffnung des Translokons auf der luminalen Seite führt (Brodsky et al., 1995; Young et al., 2001). In der Hefe wurde eine Funktion von Sec62p beim cotranslationalen Transport ausgeschlossen (Young et al., 2001), doch im Säuger deuten mehrere Tatsachen darauf hin, dass Sec62p ein Bindeglied in der Signalkaskade darstellt, welche die cytosolische und luminale Seite des Translokons verbindet. Erstens interagiert Sec62p mit translatierenden und nicht translatierenden Ribosomen durch ein Peptidmotiv, das in dem homologen Protein der Hefe nicht vorkommt (diese Arbeit und Anika Müller, persönliche Mitteilung), zweitens interagieren Sec62p und Sec63p miteinander (Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000), und drittens kommen diese Proteine in äquimolarer Konzentration mit Sec61α (Kernkomponente des Translokons für cotranslationalen Transport) in der ER-Membran vor (Tyedmers et al., 2000). Sec62p könnte daher in einem frühen Stadium der Translokation durch Interaktion mit dem Ribosom und Sec63p das Signal vermitteln, das zur Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon und zur Öffnung der Pore führt. Die elektrostatische Natur der Bindung zwischen Sec62p und dem Ribosom stimmt überein mit der beschriebenen salzsensitiven Interaktion des Ribosoms mit dem Translokon (Murphy et al., 1997), die in diesem ersten Stadium der Translokation, bevor die Interaktion der Signalsequenz mit Sec61α stattfindet, vorkommt. Für seine Funktionen bei der Translokation wird BiP durch die J-Domänen von translokonassoziierten Membranproteinen zum Translokon rekrutiert. So wird die Anwesenheit des Chaperons und dessen Aktivierung am Ort des Transports sichergestellt. Es wäre denkbar, dass auch Grp170 zur Fertigstellung des ATP-ADP-Zyklus von BiP zum Translokon rekrutiert wird (siehe IV.1.2). Die luminale Domäne von Sec62p stellt ein konserviertes hydrophobes Oligopeptid mit Ähnlichkeit zu Sequenzen dar, die von Hsp70-Chaperonen gebunden werden. Obwohl noch keine Interaktion zwischen Sec62p und Grp170 gezeigt wurde (Tyedmers, 2001) könnte man spekulieren, dass die Interaktion von Sec62p mit Ribosomen auf der cytosolischen Seite Konformationsänderungen auf der luminalen Seite verursacht, so dass dieses Oligopeptid zur Rekrutierung von Grp170 exponiert wäre. Dadurch würde das Gleichgewicht im ATP/ADP-Zyklus von BiP zur ATP-Form verschoben, was zur Öffnung der Translokationspore führen würde (siehe IV.1.2).

Während der Insertion von Membranproteinen in die ER-Membran erkennt das Ribosom den Durchgang der TM-Domänen durch den ribosomalen Tunnel und geht Konformationsänderungen ein, die mit Veränderungen in der Ribosom-Translokon-Interaktion und mit der Versiegelung der luminalen Seite des Translokons durch BiP korrelieren (Woolhead *et al.*, 2004). In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine TM-Domäne im ribosomalen Tunnel mit drei ribosomalen Proteinen, wahrscheinlich L4, L17 und L39, interagiert. L17 ist ein längliches Protein, das sich vom ribosomalen Tunnel in der Nähe des Peptidyltransferase-Zentrums bis in die Oberfläche der großen Untereinheit im Bereich des Tunnelausgangs erstreckt. L39 ist am Ende des ribosomalen Tunnels positioniert. Die Interaktion einer TM-Domäne mit L17 korreliert mit dem Verschluss des Translokationskanals durch BiP. Die spätere Interaktion mit L39 induziert wahrscheinlich Veränderungen der Ribosom-Translokon-Interaktion, so dass die cytosolischen Domänen des synthetisierten Proteins Durchgang zum Cytosol bekommen. Es wurde vorgeschlagen, dass der Mechanismus für die transmembranäre Signalübertragung eine Reihe von naszierender TM-Sequenz-abhängiger Konformationsänderungen involviert, die L17, L39, mindestens ein Protein des Translokons, BiP und andere unbekannte ribosomale und luminale Komponenten einschließt. Sec62p, das mit den Ribosomen wahrscheinlich im Bereich des Tunnelausgangs interagieren kann, könnte das für die Signalübertragung verantwortliche Protein des Translokons darstellen. Die Konformationsänderungen des Ribosoms könnten Einfluss auf seine Interaktion mit Sec62p haben und somit zu Sec63p und dadurch zu BiP übertragen werden, so dass der gezielte Effekt auf der luminalen Seite des Translokons erreicht wäre.

Dass Translokons, die ausschließlich aus dem Sec61-Komplex, d. h. ohne Sec62p und Sec63p, bestehen, durch Interaktion mit dem translatierenden Ribosom geöffnet werden können (Görlich und Rapoport, 1993; Wirth *et al.*, 2003), scheint in Widerspruch mit einer Funktion dieser Proteine bei der Vermittlung zur Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon und zur Öffnung des Kanals zu stehen. Diese Untersuchungen wurden jedoch in Abwesenheit von BiP durchgeführt. BiP interagiert mit dem Translokon und versiegelt dessen luminale Seite vor und früh während der Translokation oder Insertion eines Proteins (siehe oben). Der Wirkungsmechanismus von BiP könnte darin bestehen, Konformationsänderungen des Translokons, die zur Öffnung der Pore führen, zu vermeiden (siehe IV.1.2). In Abwesenheit von BiP könnte allein die Interaktion des Ribosoms und der Signalsequenz mit dem Translokon die Konformationsänderungen des Translokons induzieren und somit zur Öffnung des Kanals führen. Sec62p und Sec63p wären in diesem Fall nicht notwendig, um das Signal zur Öffnung der Pore zu vermitteln.

Eine schematische Darstellung des Modells der Funktion von Sec62p bei der cotranslationalen Translokation ist in Abb. 47 gezeigt.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) ist der erste Schritt in der Biogenese sekretorischer Proteine. Im Säuger erfolgt der Transport hauptsächlich cotranslational, was eine enge Kooperation zwischen Ribosom, Translokon an der ER-Membran und luminalen Proteinen erfordert. Die Hauptkomponente des Translokons ist der Sec61-Komplex, der die Translokationspore bildet. Weitere Komponenten, Sec62p und Sec63p, wurden identifiziert. Diese Proteine (a) kommen in äquimolaren Konzentrationen mit Sec61α (Untereinheit des Sec61-Komplexes) vor (b) interagieren miteinander und mit dem Sec61-Komplex und (c) seine Homologe in der Hefe sind für den posttranslationalen Transport und Sec63p auch für den cotranslationalen Transport essentiell. Dies deutet darauf hin, dass Sec62p und Sec63p des Säugers am cotranslationalen Transport beteiligt sind.

Eine Sequenzanalyse von Sec62p zeigt die Anwesenheit eines im Hefeprotein nicht konservierten basischen Peptidmotives, das charakteristisch für ribosominteragierende Proteine ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Fragmente des Säuger-Sec62p in E. coli synthetisiert und es wurde durch klassische Ribosomenbindungs- und Fraktionierungstudien gezeigt, dass Sec62p durch seine N-terminale cytosolische Domäne direkt mit Ribosomen interagiert. Hierbei handelt es sich um eine bei physiologischer Salzkonzentration stabile elektrostatische Interaktion, wofür das basische Motiv wichtig ist. Mittels Kompetitionsanalysen für die Bindung an Ribosomen wurde gezeigt, dass die Bindungsstelle von Sec62p mit dem Bereich des Ribosoms, das für die Interaktion mit dem Translokon verantworlich ist, überlappt, und dass diese Bindungsstelle auch von dem Hsp40-Chaperon Mtj1p/ERj1p verwendet wird. Die funktionelle Bedeutung der Sec62p-Ribosom-Interaktion wurde in einem zellfreien in vitro-Translationssystem untersucht. Sec62p wirkt inhibitorisch auf die Proteinsynthese von sekretorischen und nichtsekretorischen Proteinen. Hierbei handelt es sich um eine Hemmung der Initiation der Translation. Die Interaktion von Sec62p am ribosomalen Tunnelausgang bewirkt Veränderungen in der Translationsfaktorenbindungstelle des Ribosoms, was auf einen allosterischen Wirkungsmechanismus für die Induktion der Translationshemmung hindeutet. Der Einfluss von Sec62p auf die Proteinsynthese bei Translokationsvorgängen wird diskutiert und anhand der Analogien mit Mti1p wird eine Regulation von Sec62p über seine Interaktion mit Sec63p vorgeschlagen. Die

in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen ein Modell, bei dem Sec62p durch die Interaktion mit Ribosomen und wahrscheinlich auch durch Interaktion mit Sec63p einen Informationsaustausch zwischen dem Cytosol und dem Lumen des endoplasmatischen Retikulums vermittelt.

Das luminale Hsp70-Chaperon BiP ist an mehreren Stadien des cotranslationalen Proteintransports beteiligt. Für späte Schritte der Translokation wurde beobachtet, dass BiP durch seine Interaktion mit dem zu transportierenden Substrat die Translokationseffizienz erhöht. Es wurde vorgeschlagen, dass in Analogie zum Hefe-System BiP die naszierende Kette während ihrer Translokation bindet und dadurch die Unidirektionalität des Transports zum Lumen gewährleistet. Bei der cotranslationalen Translokation in Vesikeln, die keine luminalen Proteine enthalten, können bereits luminal modifizierte Translokationssubstrate zurück ins Cytosol gelangen. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion von BiP mit dem Substrat tatsächlich erst nach dem vollständigen Transport des Substrats erfolgt, um dieses im ER-Lumen zu halten. In der vorliegenden Arbeit wurde der cotranslationale Transport in einem in vitro-System mit Proteoliposomen rekonstituiert, wobei das Protein Avidin als artifizielles luminales Protein anstelle von BiP und biotinylierte Substrate eingesetzt wurden. Die gewonnenen Daten zeigen, dass die Bindung des Substrats, die zur Erhöhung der Transporteffizienz führt, sowohl während als auch nach seiner Translokation erfolgt. Dies bestätigt die bisher vermutete Funktion von BiP, die Unidirektionalität des cotranslationalen Transports zu sichern, und zeigt darüber hinaus eine erweitete Funktion von BiP bei der Retention von bereits translozierten Substraten im Lumen des ER. Diese Erkenntnise bringen neue Aspekte im Zusammenhang mit der Termination der Translokation, die in einem Modell dargestellt werden.

## SUMMARY

The transport into the endoplasmic reticulum (ER) is the first step in the biogenesis of secretory proteins. In mammalian cells this transport occurs mainly cotranslationally and requires a tight cooperation between the ribosome, the translocon at the ER-membrane, and luminal proteins. The Sec61-complex that builds the translocation pore is the main component of the translocon. Further components, namely Sec62p and Sec63p, have been identified. These proteins a) are present in equimolar concentrations with the Sec61-complex and c) in yeast are essential for the posttranslational transport (Sec63p for the cotranslational transport as well). This suggests that mammalian Sec62p and Sec63p are involved in cotranslational protein transport.

The sequence analysis of Sec62p reveals the presence of a basic peptide motif which is not conserved in the yeast homolog and that is characteristic of ribosome interacting proteins. In the present work, fragments of the mammalian Sec62p were synthesized in *E. coli* and analyzed in classical ribosome binding assays. It was shown that Sec62p interacts directly with ribosomes through its N-terminal domain. This interaction is an electrostatic and at physiological salt concentrations stable one, for which the basic motif in Sec62p is important. Through competition analysis for the binding to ribosomes it was shown, that the binding site of Sec62p at the ribosome is overlapping with the binding site of the translocon and of the Hsp40-chaperone Mtj1p/ERj1p. The functional significance of the Sec62p-ribosome interaction was analyzed in a cell-free in vitro-translation system. Sec62p inhibits the protein synthesis of secretory and non-secretory proteins. To do this, Sec62p acts at the level of translation initiation. The interaction of Sec62p with the ribosomal tunnel causes changes in the ribosomal binding site for the translation factors. This points to an allosteric mechanism by which Sec62p induces the inhibition of translation. The influence of Sec62p on protein synthesis is discussed and in analogy to Mtj1p a regulation of Sec62p through its interaction with Sec63p is proposed. The data that have been obtained in this work support a model in which Sec62p mediates an information exchange between the cytosol and the lumen of the endoplasmic reticulum through its interaction with ribosomes and probably Sec63p.

The luminal Hsp70-chaperone BiP participates in several stages of cotranslational protein transport. For late steps of translocation it was shown, that BiP increases the translocation efficiency through its interaction with the transportsubstrate. It was suggested that, in analogy to the yeast system, BiP binds to the nascent chain during its translocation and determines the unidirectionality of the transport into the lumen. However, studying the cotranslational translocation into vesicles lacking luminal proteins, it was shown, that luminally modified transportsubstrates can get back into the cytosol. Thus, there is the possibility that BiP actually interacts with the substrate not during but after its transport to retain it in the ER-lumen. In the present work the cotranslational transport was reconstituted in an *in vitro*-system with proteoliposomes where biotinylated substrates and the protein avidin, as an artificial luminal protein instead of BiP, were used. The results of this analysis show that the binding of the transport-substrates leads to an increase in transport-efficiency and occurs both during and after translocation of the substrates. This confirms the so far assumed function of BiP in ensuring the unidirectionality of the transport and, additionally, gives evidence of a more extensive function of BiP in the retention of already translocated substrates in the lumen of the endoplasmic reticulum.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Abell, B. M., Jung, M., Oliver, J. D., Knight, B. C., Tyedmers, J., Zimmermann, R. und High, S. (2003). Tail-anchored and Signal-anchored Proteins Utilize Overlapping Pathways during Membrane Insertion. J Biol Chem 278, 5669-5678.
- Abell, B. M., Pool, M. R., Schlenker, O., Sinning, I. und High, S. (2004). Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. EMBO J 23, 2755-2764.
- Alder, N. N., Shen, Y., Brodsky, J. L., Hendershot, L. M. und Johnson, A. E. (2005). The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. J Cell Biol *168*, 389-399.
- Allen, G. S., Zavialov, A., Gursky, R., Ehrenberg, M. und Frank, J. (2005). The cryo-EM structure of a translation initiation complex from Escherichia coli. Cell *121*, 703-712.
- Banecki, B., Liberek, K., Wall, D., Wawrzynów, A., Georgopoulous, C., Bertoli, E., Tanfani, F. und Zylicz, M. (1996). Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. J Biol Chem 271, 14840-14848.
- Barnes, W. (1994). PCR Amplification of up to 35-kb DNA with High Fidelity and High Yield from {lambda} Bacteriophage Templates. PNAS *91*, 2216-2220.
- Baxter, B., James, P., Evans, T. und Craig, E. (1996). SSI1 encodes a novel Hsp70 of the Saccharomyces cerevisiae endoplasmic reticulum. Mol Cell Biol *16*, 6444-6456.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W. und Craig, E. A. (1996). Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. Mol Cell Biol *16*, 4378-4386.
- 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. Science *278*, 2132-2126.
- Beckmann, R., Spahn, C. M. T., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J. und Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. Cell *107*, 361-372.
- Beggah, A., Mathews, P., Beguin, P. und Geering, K. (1996). Degradation and Endoplasmic Reticulum Retention of Unassembled alpha - and beta -Subunits of Na,K-ATPase Correlate with Interaction of BiP. J Biol Chem *271*, 20895-20902.
- Bernstein, H. D., Poritz, M. A., Strub, K., Hoben, P. J., Brenner, S. und Walter, P. (1989). The aminoacid sequence of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle suggests a model for signal sequence recognition. Nature *340*, 482-486.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. und Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol 2, 326-332.
- Bies, C., Blum, R., Dudek, J., Nastainczyk, W., Oberhauser, S., Jung, M. und Zimmermann, R. (2004). Characterization of pancreatic ERj3p, a homolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p. Biol Chem 385, 389-395.
- Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R. (1999). A Scj1p homologue and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. Biol Chem 380, 1175-1182.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7, 1513.
- Blanchard, S. C., Gonzalez, R. L., Kim, H. D., Chu, S. und Puglisi, J. D. (2004). tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *11*, 1008-1014.

- Blau, M., Mullapudi, S., Becker, T., Dudek, J., Zimmermann, R., Penczek, P. A. und Beckmann, R. (2005). ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *12*, 1015-1016.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975a). Transfer of proteins across membranes. J Cell Biol 67, 845-885.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975b). 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*, 835-851.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975c). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J Cell Biol 67, 852-862.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipschutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J.
   F. und Gething, M.-J. H. (1993a). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. Cell *75*, 717-728.
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A., Sambrook, J. und Gething, M. (1993b). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. J Biol Chem *268*, 12730-12735.
- Blount, P. und Merlie, J. (1991). BIP associates with newly synthesized subunits of the mouse muscle nicotinic receptor. J Cell Biol *113*, 1125-1132.
- Boisramé, A., Beckerich, J.-M. und Gaillardin, C. (1996). Sls1p, an endoplasmic reticulum component, is involved in the protein translocation process in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Biol Chem *271*, 11668-11675.
- Boisramé, A., Kabani, M., Beckerich, J.-M., Hartmann, E. und Gaillardin, C. (1998). Interaction of Kar2p and SIs1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yaworria lipolytica*. J Biol Chem 273, 30903-30908.
- Boorstein, W. R., Ziegelhofer, T. und Craig, E. A. (1993). Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. J Mol Evol *38*, 1-17.
- Borel, A. C. und Simon, S. M. (1996). Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. Cell *85*, 379-389.
- Borgese, N., Mok, K., Kreibich, G. und Sabatini, D. D. (1974). Ribosome-membrane interaction: *in vitro*-binding of ribosomes to microsomal membranes. J Mol Biol *88*, 559-580.
- Brightman, S. E., Blatch, G. L. und Zette, B. R. (1995). Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins. Gene *153*, 249-254.
- Brizzio, V., Khalfan, W., Huddler, D., Beh, C. T., Andersen, S. S. L., 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*, 609-626.
- Brodsky, J., Goeckeler, 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*, 9643-9646.
- Brodsky, J. und Schekman, R. (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. J Cell Biol *123*, 1355-1363.
- Brodsky, J. L. und McCracken, A. A. (1999). ER protein quality control and proteasomemediated protein degradation. Semin Cell Dev Biol *10*, 507-513.
- Brodsky, J. L. und Schekman, R. (1994). In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., eds) Plainview, NY, Cold Spring Laboratory Press, pp. 85-109.
- Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goeckeler, J. L., Kruse, K. B. und McCracken, A. A. (1999). The Requirement for Molecular Chaperones during Endoplasmic Reticu-

lum-associated Protein Degradation Demonstrates That Protein Export and Import Are Mechanistically Distinct. J Biol Chem 274, 3453-3460.

Buchberger, A., Schröder, H., Hesterkamp, T., Schönfeld, H.-J. und Bukau, B. (1996). Substrate shuttling between DnaK und GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. J Mol Biol *261*, 328-333.

Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-366.

- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem *112*, 195-203.
- Calfon, M., Zeng, H., Uraj.no, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. und Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by procesing the XBP-1 mRNA. Nature *415*, 92-96.
- Caplan, A. J., Cyr, D. M. und Douglas, M. G. (1992a). Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. Cell *71*, 1143-1455.
- Caplan, A. J., Tsai, J., Casey, P. J. und Douglas, M. G. (1992b). Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 267, 18890-18895.
- Carlsson, L. und Lazarides, E. (1983). ADP-ribosylation of the Mr 83,000 stress-inducible and glucose-regulated protein in avian and mammalian cells: modulation by heat shock and glucose starvation. PNAS *80*, 4464-4468.

Carrigan, P. E., Nelson, G. M., Roberts, P. J., Stoffer, J. N., Riggs, D. L. und Smith, D. F. (2004). Multiple Domains of the Co-chaperone Hop Are Important for Hsp70 Binding. J Biol Chem 279, 16185-16193.

Carter, A. P., Clemons, W. M. J., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Hartsch, T., Wimberly, B. T. und Ramakrishnan, V. (2001). Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. Science 291, 498-501.

- Chappell, T., Konforti, B., Schmid, S. und Rothman, J. (1987). The ATPase core of a clathrin uncoating protein. J Biol Chem 262, 746-751.
- Cheetham, M. E. und Caplan, A. J. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adptation of chaperone function. Cell Stress Chaperones *3*, 28-36.
- Chen, X., Easton, D., Oh, H. J., Lee-Yoon, D. S., Liu, X. und Subjeck, J. (1996). The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-, HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum. FEBS Lett *380*, 68-72.
- Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E. C. und Blond, S. Y. (2000). Interaction of Murine BiP/GRP78 with the DnaJ Homologue MTJ1. J Biol Chem 275, 19620-19627.
- Chevet, E., Cameron, P. H., Pellletier, M. F., Thomas, D. Y. und Bergeron, J. J. M. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. Curr Opin Struct Biol *11*, 120-124.
- Chillaron, J. und Haas, I. G. (2000). Dissociation from BiP and Retrotranslocation of Unassembled Immunoglobulin Light Chains Are Tightly Coupled to Proteasome Activity. Mol Biol Cell *11*, 217-226.
- Chirico, W. J., Waters, M. G. und Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature *332*, 805-810.
- Choi, S. K., Olsen, D. S., Roll-Mecak, A., Martung, A., Remo, K. L., Burley, S. K., Hinnebusch, A.
   G. und Dever, T. E. (2000). Physical and Functional Interaction between the Eukaryotic Orthologs of Prokaryotic Translation Initiation Factors IF1 and IF2. Mol Cell Biol *20*, 7183-7191.
- Chung, K. T., Shen, Y. und Hendershot, L. M. (2002). BAP, a Mammalian BiP-associated Protein, Is a Nucleotide Exchange Factor That Regulates the ATPase Activity of BiP. J Biol Chem 277, 47557-47563.

- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Höhfeld, J. und Patterson,C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heatshock proteins. Nat Cell Biol *3*, 93-96.
- Connolly, T. und Gilmore, R. (1986). Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. J Cell Biol *103*, 2253-2261.
- Connolly, T., Rapiejko, P. J. und Gilmore, R. (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. Science *252*, 1171-1173.
- Conolly, T. und Gilmore, R. (1989). The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypep-tide. Cell *57*, 599-610.
- Corsi, A. K. und Schekman, R. (1997). The Lumenal Domain of Sec63p Stimulates the AT-Pase Activity of BiP and Mediates BiP Recruitment to the Translocon in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol *137*, 1483-1493.
- Craig, E. A. (1985). The heat shock response. CRC Crit Rev Biochem 18, 239-280.
- Craven, R. A., Egerton, M. und Stirling, C. J. (1996). A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. EMBO J *15*, 2640-2650.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D. und Johnson, A. E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. Cell *78*, 461-471.
- Cunnea, P. M., Miranda-Vizuete, A., Bertoli, G., Simmen, T., Damdimopoulos, A. E., Hermann, S., Leinonen, S., Huikko, M. P., Gustafsson, J.-A., Sitia, R. und Spyrou, G. (2003). ERdj5, an Endoplasmic Reticulum (ER)-resident Protein Containing DnaJ and Thioredoxin Domains, Is Expressed in Secretory Cells or following ER Stress. J Biol Chem 278, 1059-1066.
- Cyr, D. M., Lu, X. und Douglas, M. G. (1992). Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homologue. J Biol Chem 267, 20927-20931.
- 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 Comm 230, 100-104.
- Dalbey, R. E. und von Heijne, G., eds. (2002). Protein Targeting, Transport and Translocation (Academic Press).
- de Virgilio, M., Kitzmuller, C., Schwaiger, E., Klein, M., Kreibich, G. und Ivessa, N. E. (1999). Degradation of a Short-lived Glycoprotein from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: The Role of N-linked Glycans and the Unfolded Protein Response. In Mol. Biol. Cell, pp. 4059-4073.
- Dekker, P. J. und Pfanner, N. (1997). Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the AT-Pase cycle of matrix Hsp70. J Mol Biol *270*, 321-327.
- Deshaies, R., Sanders, S., Feldheim, D. und Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. Nature *349*, 806-808.
- Deshaies, R. und Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. J Cell Biol *109*, 2653-2664.
- Deshaies, R. J., Koch, D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A. und Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature *332*, 800-805.
- Deshaies, R. J. und Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. J Cell Biol *105*, 633-645.
- Dierks, T., Volkmer, J., Schlenstedt, G., Jung, C., Sandholzer, U., Zachmann, K., Schlotterhose, P., Neifer, K., Schmidt, B. und Zimmermann, R. (1996). A microsomal ATP-

binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. EMBO J *15*, 6931-6942.

- Doohan, J. P. und Samuel, C. E. (1992). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: ribosome pausing during the translation of reovirus S1 mRNA. Virology *186*, 409-425.
- Driessen, A. J. M. (2005). Cell biology: Two pores better than one? 438, 299-300.
- Dudek, J. (2002) Charakterisierung des molekularen Chaperons Mtj1p in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Dudek, J., Díaz de Escauriaza, M., Müller, A., Nastainczyk, W., Scholtes, P. und Zimmermann, R. (2006). Signal Recognition Particle Mediated Arrest of Translation Involves Competition with eEF2 on the Ribosome. J Biol Sci *6*, 316-319.
- Dudek, J., Greiner, M., Anika, M., Hendershot, L. M., Kopsch, K., Nastainczyk, W. und Zimmermann, R. (2005). ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. Nature Struct and Mol Biol *12*, 1008-1014.
- Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Muller, A., Lerner, M., Feick, P., Schafer, K.-H., Morgenstern, E., Hennessy, F., *et al.* (2002). A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. EMBO J *21*, 2958-2967.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. und Johnsson, N. (1999). Detection of transient in vivo interaction between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell *10*, 329-344.
- Egea, P. F., Shan, S.-o., Napetschnig, L., Savage, D. F., Walter, P. und Stroud, R. M. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. Nature *427*, 215-221.
- Eilers, M. und Schatz, G. (1988). Protein unfolding and the energetics of protein tranlocation across biological membranes. Cell *52*, 481-483.
- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J. und Schmitt, M. J. (2000). Endocytic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. Mol Microbiol *37*, 926-940.
- Eki, T., Naitou, M., Hagiwara, H., Ozawa, M., Sasanuma, S. I., Sasanuma, M., Tsuchiya, Y., Shibata, T., Hanaoka, F. und Murakami, Y. (1996). Analysis of a 36.2 kb DNA sequence including the right telomere of chromosome VI from Saccharomyces cerevisiae. Yeast *12*, 149-167.
- Ellgaard, L. und Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. EMBO Reports *6*, 28-32.
- Elston, T. C. (2002). The Brownian Ratchet and Power Stroke Models for Posttranslational Protein Translocation into the Endoplasmic Reticulum. Biophys J *82*, 1239-1253.
- Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S. und Boger, J. (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol *55*, 836-839.
- Fang, H. und Green, N. (1994). Nonlethal sec71-1 and sec72-1 mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from S. cerevisiae. Mol Biol Cell *5*, 933-942.
- Fedorov, A. N. und Baldwin, T. O. (1997). Cotranslational Protein Folding. J Biol Chem 272, 32715-32718.
- Feldheim, D., Rothblatt, J. und Schekman, R. (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. Mol Cell Biol *12*, 3288-3296.
- Feldheim, D. und Schekman, R. (1994). Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. J Cell Biol *126*, 935-943.
- 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*, 931-939.
- Ferrari, D. M. und Söling, H.-D. (1999). The protein disulfide-isomerase family: unravelling a string of folds. Biochem J 339, 1-10.

- Fewell, S. W., Travers, K. J., Weissman, J. S. und Brodsky, J. L. (2001). The Action of Molecular Chaperones in the Early Secretory Pathway. Annu Rev Genet *35*, 149-191.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T., 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, 1482-1494.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C. und McKay, D. B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. Nature *346*, 623-628.
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. und Rothman, J. E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. Nature *353*, 726-730.
- Focia, P. J., Shepotinovskaya, I. V., Seidler, J. A. und Freymann, D. M. (2004). Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. Science *303*, 373-377.
- Fons, R. D., Bogert, B. A. und Hegde, R. S. (2003). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. J Cell Biol *160*, 529-539.
- Freiden, P., Gaut, J. und Hendershot, L. (1992). Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. EMBO J *11*, 63-70.
- Frydman, J. und Hartl, F. U. (1994). Molecular chaperone function of hsp70 and hsp60 in protein folding. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., eds) Plainview, NY, Cold Spring Laboratory Press, pp. 251-284.
- Frydman, J. und Höhfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. Trends Biochem Sci 22, 87-92-.
- Fulga, T. A., Sinning, I., Dobberstein, B. und Pool, M. R. (2001). SR{beta} coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the translocon. EMBO J *20*, 2338-2347.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J. und Robson, B. (1978). Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins. J Mol Biol *120*, 97-120.
- Gässler, C. S., Buchberger, A., Laufen, T., Mayer, M. P., Schröder, H., Valencia, A. und Bukau, B. (1998). Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. Proc Natl Acad Sci USA *95*, 15229-15234.
- Gaut, J. R. (1997). In vivo threonine phosphorylation of immunoglobulin binding protein (BiP) maps to its protein binding domain. Cell Stress Chaperones 2, 252-262.
- Georgopoulos, C., Liberek, L., Zylicz, M. und Ang, D. (1989). Stress in biology and medicine. Cold Spring Harbor Press.
- Gething, M. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. Semin Cell Dev Biol *10*, 465-472.
- Gething, M. J., Blond-Elguindi, S., Mori, K. und Sambrook, J. (1994). Structure, function, and regulation of the endoplasmic reticulum chaperone BiP. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., eds) Plainview, NY, Cold Spring Laboratory Press, pp. 111-136.
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., de la Cruz, F. J. und Römisch, K. (1999). Export of a cystein-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. EMBO J *147*, 1443-1456.
- Gilmore, R. und Blobel, G. (1983). Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. Cell *35*, 677-685.
- 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*, 463-469.

- 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*, 470-477.
- Glick, B. S. (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? Cell 80, 11-14.
- Goder, V. und Spiess, M. (2003). Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. EMBO J *22*, 3645-3653.
- Gomez-Lorenzo, M. G., Spahn, C. M. T., Agrawal, R. K., Grassucci, R. A., Penczek, P., Chakraburtty, K., Ballesta, J. P. G., Lavandera, J. L., Garcia-Bustos, J. F. und Frank, J. (2000). Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the Saccharomyces cerevisiae 80S ribosome at 17.5 A resolution. EMBO J *19*, 2710-2718.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S. und Rapoport, T. A. (1992a). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. Nature *357*, 47-52.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U. und Rapoport, T. A. (1992b). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. Cell *71*, 489-503.
- Görlich, D. und Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. Cell 75, 615-630.
- Green, N., Fang, H. und Walter, P. (1992). Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol *116*, 597-604.
- Gulow, K., Bienert, D. und Haas, I. (2002). BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. J Cell Sci *115*, 2443-2452.
- Haas, I. G. und Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. Nature *306*, 387-389.
- Haigh, N. und Johnson, A. (2002). A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. J Cell Biol *156*, 261-270.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R., Frank, J. und Beckmann, R. (2004). Structure of the signal recognition particle interacting with the elongationarrested ribosome. Nature 427, 808-814.
- Hamilton, T. G. und Flynn, G. C. (1996). Cer1p, a Novel Hsp70-related Protein Required for Posttranslational Endoplasmic Reticulum Translocation in Yeast. J Biol Chem *271*, 30610-30613.
- Hamilton, T. G., Norris, T. B., Tsuruda, P. R. und Flynn, G. C. (1996). Cer1p functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol *19*, 5298-5307.
- Hamman, B. D., Chen, J.-C., Johnson, E. E. und Johnson, A. E. (1997). The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. Cell *89*, 535-544.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M. und Johnson, A. E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. Cell *92*, 747-758.
- Hanein, D., Matlack, K., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K., Miller, K., Rapoport, T. und Akey, C. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. Cell 87, 721-732.
- Hann, B. C. und Walter, P. (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. Cell *131*, 131-144.
- Harding, H. P., Zhang, Y. und Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature *397*, 271-274.

- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381, 571-579.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T. A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. Nature *367*, 654-657.
- Hegde, R. S., Voigt, S., Rapoport, T. A. und Lingappa, V. R. (1998). TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. Cell *92*, 621-631.
- Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J. und Rapoport, T. A. (2000). The Sec61p complex medites the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. Cell *102*.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. Science 291, 2364-2369.
- Hellman, R., Vanhove, M., Lejeune, A., Stevens, F. J. und Hendershot, L. M. (1999). The In Vivo Association of BiP with Newly Synthesized Proteins Is Dependent on the Rate and Stability of Folding and Not Simply on the Presence of Sequences That Can Bind to BiP. J Cell Biol *144*, 21-30.
- Helmers, J., Schmidt, D., Glavy, J. S., Blobel, G. und Schwartz, T. (2003). The {beta}-Subunit of the Protein-conducting Channel of the Endoplasmic Reticulum Functions as the Guanine Nucleotide Exchange Factor for the {beta}-Subunit of the Signal Recognition Particle Receptor. J Biol Chem 278, 23686-23690.
- Hendershot, L., Ting, J. und Lee, A. (1988). Identity of the immunoglobulin heavy-chainbinding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. Mol Cell Biol *8*, 4250-4256.
- Hendrick, J. P. und Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. Annu Rev Biochem *62*, 349-384.
- Hennessy, F., Nicoll, W. S., Zimmermann, R., Cheetham, M. E. und Blatch, G. L. (2005). Not all J domains are created equal: Implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. Protein Sci 14, 1697-1709.
- High, S., Andersen, S. S. L., Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A. und Dobberstein, B. (1993). Sec61p is adjecent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion. J Cell Biol *121*, 743-750.
- High, S., Flint, N. und Dobberstein, B. (1991a). Requirements for the membrane insertion of signal-anchor type proteins. J Cell Biol *113*, 25-34.
- High, S., Görlich, D., Wiedmann, M., Rapoport, T. A. und Dobberstein, B. (1991b). The identification of proteins in the proximity of signal-anchor sequences during their targeting to and insertion into the membrane of the ER. J Cell Biol *113*, 35-44.
- High, S. und Laird, V. (1997). Membrane protein biosynthesis-all sewn up? Trends Cell Biol 7, 206-210.
- High, S., Lecomte, F. J. L., Russell, S. J., Abell, B. M. und Oliver, J. D. (2000). Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? FEBS Letters *476*, 38-41.
- Hill, R. B., Flanagan, J. M. und Prestegard, J. H. (1995). 1H and 15N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of Escherichia coli DnaJ(1-78). Bio-chemistry *34*, 5587-5596.
- Hoeltke, H.-J., Ettl, I., Strobel, E., Leying, H., Zimmermann, M. und Zimmermann, R. (1995). Biotin *In Vitro* Translation, Nonradioactive Detection of Cell-Free Synthesized Proteins. BioTechniques *18*, 900-903.
- Höhfeld, J. und Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the antiapoptotic protein BAG-1. EMBO J *16*, 6209-6216.
- Höhfeld, J., Minami, Y. und Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. Cell *83*, 589-598.

- Hosoda, A., Kimata, Y., Tsuru, A. und Kohno, K. (2003). JPDI, a Novel Endoplasmic Reticulum-resident Protein Containing Both a BiP-interacting J-domain and Thioredoxin-like Motifs. J Biol Chem *278*, 2669-2676.
- Hurtley, S. M., Bole, D. G., Hoover-Litty, H., Helenius, A. und Copeland, C. S. (1989). Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). J Cell Biol 108, 2117-2126.
- Ichimura, T., Ohsumi, T., Shindo, Y., Ohwada, T., Yagame, H., Momose, Y., Omata, S. und Sugano, H. (1992). Isolation and some properties of a 34-kDa-membrane protein that may be responsible for ribosome binding in rat liver rough microsomes. FEBS Lett 296, 7-10.
- Ikeda, J., Kaneda, S., Kuwabara, K., Ogawa, S., Kobashi, T., Matsumoto, M., Yura, T. und Yanagi, H. (1997). Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150. Biochem Biophys Res Comm *230*, 94-99.
- Ito, K., Date, T. und Wickner, W. (1980). Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. J Biol Chem *255*, 2123-2130.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A. und Kohno, K. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. Nat Cell Biol *3*, 158-164.
- Jackson, R. C. und Blobel, G. (1977). Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase. Proc Natl Acad Sci USA *74*, 5598-5602.
- Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, M., Gambetti, P. und Singh, N. (2000). The Chaperone Protein BiP Binds to a Mutant Prion Protein and Mediates Its Degradation by the Proteasome. J Biol Chem *275*, 38699-38704.
- Johnson, J. L. und Craig, E. A. (2001). An Essential Role for the Substrate-binding Region of Hsp40s in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol *152*, 851-856.
- Joly, J. C. und Wickner, W. (1993). The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. EMBO J *12*, 255-263.
- Jungnickel, B. und Rapoport, T. A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. Cell *82*, 261-270.
- Kabani, M., Beckerich, J.-M. und Brodsky, J. L. (2002a). Nucleotide Exchange Factor for the Yeast Hsp70 Molecular Chaperone Ssa1p. Mol Cell Biol *22*, 4677-4689.
- Kabani, M., Beckerich, J.-M. und Gaillardin, C. (2000). Sls1p Stimulates Sec63p-Mediated Activation of Kar2p in a Conformation-Dependent Manner in the Yeast Endoplasmic Reticulum. Mol Cell Biol *20*, 6923-6934.
- Kabani, M., Kelley, S. S., Morrow, M. W., Montgomery, D. L., Sivendran, R., Rose, M. D., Gierasch, L. M. und Brodsky, J. L. (2003). Dependence of Endoplasmic Reticulumassociated Degradation on the Peptide Binding Domain and Concentration of BiP. Mol Biol Cell *14*, 3437-3448.
- Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D. A., Guerriero, V. und Brodsky, J. L. (2002b). HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. FEBS Letters *531*, 339-342.
- Kalies, K. U., Görlich, D. und Rapoport, T. A. (1994). Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. J Cell Biol *126*, 925-934.
- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S. V., Ehrlich, R. und Lederkremer, G. Z. (2001). A Novel Quality Control Compartment Derived from the Endoplasmic Reticulum. Mol Biol Cell *12*, 1711-1723.
- Karzai, A. W. und McMacken, R. (1996). A bipartite signaling mechanism involved in DnaJmediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. J Biol Chem 271, 11236-11246.

- Kassenbrock, C. und Kelly, R. (1989). Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. EMBO J *8*, 1461-1467.
- Kassenbrock, C. K., Garcia, P. D., Walter, P. und Kelly, R. B. (1988). Heavy-chain binding protein recognizes abberant polypeptides translocated *in vitro*. Nature *335*, 90-93.
- Kellaris, K. V., Bowen, S. und Gilmore, R. (1991). ER translocation intermediates are adjacent to a nonglycosylated 34-kD integral membrane protein. J Cell Biol *114*, 21-33.
- Kimata, Y., Kimata, Y. I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., Rose, M. D. und Kohno, K. (2003). Genetic Evidence for a Role of BiP/Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins. Mol Biol Cell 14, 2559-2569.
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y. und Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. J Cell Biol *167*, 445-456.
- Klappa, P., Freedman, R. B. und Zimmermann, R. (1995). Protein disulphide isomerase and a lumenal cyclophilin-type peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. Eur J Biochem 232, 755-764.
- Klappa, P., Mayinger, P., Pipkorn, R., Zimmermann, M. und Zimmermann, R. (1991). A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. EMBO J 10, 2795-2803.
- Knauer, R. und Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. Biochim Biophys Acta *1426*, 259-273.
- Knittler, M. und Haas, I. (1992). Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. EMBO J *11*, 1573-1581.
- Knittler, M. R., Dirks, S. und Haas, I. G. (1995). Molecular chaperones involved in the protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci USA *92*, 1764-1768.
- Kota, J. und Ljungdahl, P. O. (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. J Cell Biol *168*, 79-88.
- Kramer, G., Ramachandiran, V., Horowitz, P. und Hardesty, B. (2001). An additional serine residue at the C terminus of rhodanese destabilizes the enzyme. Arch Biochem Biophys *385*, 332-337.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. Nucl Acids Res *12*, 7057-7070.
- Krieg, U., Johnson, A. und Walter, P. (1989a). Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel. J Cell Biol *109*, 2033-2043.
- Krieg, U. C., Johnson, A. E. und Walter, P. (1989b). Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel. J Cell Biol *109*, 2033-2043.
- Kroczynska, B., Evangelista, C. M., Samant, S. S., Elguindi, E. C. und Blond, S. Y. (2004). The SANT2 Domain of the Murine Tumor Cell DnaJ-like Protein 1 Human Homologue Interacts with {alpha}1-Antichymotrypsin and Kinetically Interferes with Its Serpin Inhibitory Activity. J Biol Chem 279, 11432-11443.
- Kurzchalia, T. V., Wiedmann, M., Girshovich, A. S., Bochkareva, E. S., Bielka, H. und Rapoport, T. A. (1986). The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. Nature *320*, 634-636.
- Kuznetsov, G., Chen, L. B. und Nigam, S. K. (1997). Multiple Molecular Chaperones Complex with Misfolded Large Oligomeric Glycoproteins in the Endoplasmic Reticulum. J Biol Chem 272, 3057-3063.

- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J Mol Biol *157*, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Laitusis, A. L., Brostrom, M. A. und Brostrom, C. O. (1999). The Dynamic Role of GRP78/BiP in the Coordination of mRNA Translation with Protein Processing. J Biol Chem 274, 486-493.
- Latterich, M. und Schekman, R. (1994). The karyogamy gene KAR2 and novel proteins are required for ER-membrane fusion. Cell *78*, 87-98.
- Lau, P. P., Villanueva, H., Kobayashi, K., Nakamuta, M., Chang, B. H.-J. und Chan, L. (2001). A DnaJ Protein, Apobec-1-binding Protein-2, Modulates Apolipoprotein B mRNA Editing. J Biol Chem 276, 46445-46452.
- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. und Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. PNAS 96, 5452-5457.
- Lauring, B., Kreibich, G. und Wiedmann, M. (1995a). The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. Proc Natl Acad Sci USA *92*, 9435-9439.
- Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G. und Wiedmann, M. (1995b). Nascent polypeptideassociated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci USA 92, 5411-5415.
- Le Gall, S., Neuhof, A. und Rapoport, T. A. (2004). The Endoplasmic Reticulum Membrane Is Permeable to Small Molecules. Mol Biol Cell *15*, 447-455.
- Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E. P. W. M., Crofts, A. J. und Denecke, J. (1999). Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. Plant Cell *11*, 459-470.
- Ledford, B. E. und Leno, G. H. (1994). ADP-ribosylation of the molecular chaperone GRP78/BiP. Mol Cell Biochem *138*, 141-148.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. und Kaufman, R. J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2Pmediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. Genes Dev 16, 452-466.
- Leno, G. H. und Ledford, B. E. (1990). Reversible ADP-ribosylation of the 78 kDa glucoseregulated protein. FEBS Lett 276, 29-33.
- Leustek, T., Toledo, H., Brot, N. und Weissbach, H. (1991). Calcium-dependent autophosphorylation of the glucose-regulated protein, Grp78. Arch Biochem Biophys 289, 256-261.
- Levy, R., Wiedmann, M. und Kreibich, G. (2001). *In vitro* Binding of Ribosomes to the β-Subunit of the Sec61p Protein Translocation Complex. J Biol Chem 276, 2340-2346.
- Liao, S., Lin, J., Do, H. und Johnson, A. E. (1997). Both lumenal and cytosolic gating of aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. Cell *90*, 31-41.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1991). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity od DnaK. Proc Natl Acad Sci USA *88*, 2874-2878.
- Liebermeister, W., Rapoport, T. A. und Heinrich, R. (2001). Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. J Mol Biol *305*, 643-656.
- Lievremont, J.-P., Rizzuto, R., Hendershot, L. und Meldolesi, J. (1997). BiP, a Major Chaperone Protein of the Endoplasmic Reticulum Lumen, Plays a Direct and Important Role in the Storage of the Rapidly Exchanging Pool of Ca2+. J Biol Chem *272*, 30873-30879.

- Lin, H., Masso-Welch, P., Di, Y., Cai, J., Shen, J. und Subjeck, J. (1993). The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. Mol Biol Cell *4*, 1109-1119.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. Annu Rev Biochem 55, 1151-1191.
- Liu, F.-H., Wu, S.-J., Hu, S.-M., Hsiao, C.-D. und Wang, C. (1999). Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. J Biol Chem 274, 34425-34432.
- Lomakin, I. B., Kolupaeva, V. G., Marintchev, A., Wagner, G. und Pestova, T. V. (2003). Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. Genes Dev *17*, 2786-2797.
- Lu, Z. und Cyr, D. M. (1998). Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by Hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. J Biol Chem 273, 27824-27830.
- Lyman, S. und Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol *131*, 1163-1171.
- Lyman, S. K. und Scheckman, R. (1996). Polypeptide translocation machinery of the yeast endoplasmic reticulum. Experientia *52*, 1042-1049.
- Machamer, C., Doms, R., Bole, D., Helenius, A. und Rose, J. (1990). Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. J Biol Chem *265*, 6879-6883.
- Mandon, E. C., Jiang, Y. und Gilmore, R. (2003). Dual recognition of the ribosome and the signal recognition particle by the SRP receptor during protein targeting to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol *162*, 575-585.
- Martoglio, B., Hofmann, M. W., Brunner, J. und Dobberstein, B. (1995). The proteinconducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the bilayer. Cell *81*, 207-214.
- Mason, N., Ciufo, L. F. und Brown, J. D. (2000). Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. EMBO J *19*, 4164-4174.
- Matlack, K., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. Cell 97, 553-564.
- Matlack, K. E. S., Plath, K., Misselwitz, B. und Rapoport, T. A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. Science 277, 938-941.
- Maurer, P., Moratzky, A., Fecher-Trost, C., Flockerzi, V., Lenk, U., Sommer, T., Völzing, C. und Zimmermann, R. (2003). Cell-free synthesis of membrane-proteins on a preparative scale.
   In: Cell-free protein expression (Swartz, J. R., ed.) Springer-Verlag Hamburg, pp. 133-139.
- McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J. und Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. J Mol Biol 249, 126-137.
- McClellan, A. J., Endres, J. B., Vogel, J. P., Palazzi, D., Rose, M. D. und Brodsky, J. L. (1998). Specific Molecular Chaperone Interactions and an ATP-dependent Conformational Change Are Required during Posttranslational Protein Translocation into the Yeast ER. Mol Biol Cell *9*, 3533-3545.
- McLaughlin, S. H. und Bulleid, N. J. (1998). Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase wih type X collagen during intracellular folding and assembly. Biochem J *331*, 793-800.
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M. und Cyr, D. M. (2001). The Hsc70 co-chaperon CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. Nat Cell Biol *3*, 100-105.

- Menetret, J. F., Hegde, R. S., Heinrich, S. U., Chandramouli, P., Ludtke, S. J., Rapoport, T. A. und Akey, C. W. (2005). Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. J Mol Biol 348, 445-457.
- Ménétret, J. F., Neuhof, A., Morgan, D. G., Plath, K., Radermacher, M., Rapoport, T. A. und Akey, C. W. (2000). The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. Mol Cell 6, 1219-1232.
- Meunier, L., Usherwood, Y.-K., Chung, K. T. und Hendershot, L. M. (2002). A Subset of Chaperones and Folding Enzymes Form Multiprotein Complexes in Endoplasmic Reticulum to Bind Nascent Proteins. Mol Biol Cell *13*, 4456-4469.
- Meyer, D. I., Krause, E. und Dobberstein, B. (1982). Secretory protein translocation across membranes the role of the "docking protein". Nature *297*, 647-650.
- 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, 14550-14557.
- Miao, B., Davis, J. E. und Craig, E. A. (1997). Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of Saccharomyces cerevisiae. J Mol Biol *265*, 541-552.
- Miller, J. D., Tajima, S., Lauffer, L. und Walter, P. (1995). The  $\beta$  subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the  $\alpha$  subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol *128*, 273-282.
- Misra, U. K., Deedwania, R. und Pizzo, S. V. (2005). Binding of Activated {alpha}2-Macroglobulin to Its Cell Surface Receptor GRP78 in 1-LN Prostate Cancer Cells Regulates PAK-2-dependent Activation of LIMK. J Biol Chem 280, 26278-26286.
- Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K. E. S. und Rapoport, T. A. (1999). Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p Component of the Endoplasmic Reticulum Protein Translocation Complex. J Biol Chem *274*, 20110-20115.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C. L., Ban, N. und Frank, J. (2005). Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. 438, 318-324.
- Molinari, M. und Helenius, A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. Science *288*, 331-333.
- Möller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B. und Wiedmann, M. (1998). Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. FEBS Letters *441*, 1-5.
- Moller, I., Jung, M., Beatrix, B., Levy, R., Kreibich, G., Zimmermann, R., Wiedmann, M. und Lauring, B. (1998). A general mechanism for regulation of access to the translocon: Competition for a membrane attachment site on ribosomes. PNAS *95*, 13425-13430.
- Morgan, D. G., Menetret, J. F., Neuhof, A., Rapoport, T. A. und Akey, C. W. (2002). Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution. J Mol Biol *324*, 871-886.
- Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Cell *101*, 451-454.
- Morimoto, R. I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C. (1994). The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Laboratory Press, Plainview, NY.
- Morris, J. A., Dorner, A., Edwards, C. A., Hendershot, L. M. und Kaufman, R. J. (1997). Immunoglobulin Binding Protein (BiP) Function Is Required to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress but Is Not Required for the Secretion of Selective Proteins. J Biol Chem 272, 4327-4334.
- Morrow, M. W. und Brodsky, J. L. (2001). Yeast Ribosomes Bind to Highly Purified Reconstituted Sec61p Complex and to Mammalian p180. Traffic 2, 705-716.

- Morshauser, R., Wang, H., Flynn, G. C. und Zuiderweg, E. R. P. (1995). The peptidebinding domain of the chaperone protein hsc70 has an unusual secondary structure topology. Biochemistry *34*, 6261-6266.
- Mothes, W., Jungnickel, B., Brunner, J. und Rapoport, T. A. (1998). Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol *142*, 355-364.
- Mothes, W., Prehn, S. und Rapoport, T. A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. EMBO J *13*, 3973-3982.
- Müller, G. und Zimmermann, R. (1987). Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. EMBO J 6, 2099-2107.
- Munro, S. und Pelham, H. R. (1986). An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell *46*, 291-300.
- Muresan, Z. und Arvan, P. (1997). Thyroglobulin Transport along the Secretory Pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, Grp94, in protein export from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem *272*, 26095-26102.
- Murphy, E. C. I., Zheng, T. und Nicchitta, C. V. (1997). Identification of a novel stage of ribosome/nascent chain association with the endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol *136*, 1213-1226.
- Müsch, A., Wiedmann, M. und Rapoport, T. A. (1992). Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. Cell *69*, 343-352.
- Mutka, S. C. und Walter, P. (2001). Multifaceted Physiological Response Allows Yeast to Adapt to the Loss of the Signal Recognition Particle-dependent Protein-targeting Pathway. Mol Biol Cell *12*, 577-588.
- Neuhof, A., Rolls, M. M., Jungnickel, B., Kalies, K.-U. und Rapoport, T. A. (1998). Binding of Signal Recognition Particle Gives Ribosome/Nascent Chain Complexes a Competitive Advantage in Endoplasmic Reticulum Membrane Interaction. Mol Biol Cell 9, 103-115.
- Ng, D., Brown, J. und Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol *134*, 269-278.
- Ng, D. und Walter, P. (1996). ER membrane protein complex required for nuclear fusion. J Cell Biol *132*, 499-509.
- Nguyen, T., Law, D. und Williams, D. (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*, 1565-1569.
- Nicchitta, C. V. und Blobel, G. (1990). Assembly of translocation-competent proteoliposomes from detergent-solubilized rough microsomes. Cell *60*, 259-269.
- Nicchitta, C. V. und Blobel, G. (1993). Lumenal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation. Cell 73, 989-998.
- Nikonov, A. V., Snapp, E., Lippincott-Schwartz, J. und Kreibich, G. (2002). Active translocon complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum. J Cell Biol *158*, 497-506.
- Nishikawa, S. und Endo, T. (1997). The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. J Biol Chem 272, 12889-12892.
- Nishikawa, S., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L. und Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast ER mantain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. J Cell Biol *153*, 1061-1069.
- Noel, P. und Cartwright, I. (1994). A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from Drosophila displays developmentally complex behavior. EMBO J *13*, 5253-5261.

- Norgaard, P., Westphal, V., Tachibana, C., Alsøe, L., Holst, B. und Winther, J. R. (2001). Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. J Cell Biol *152*, 553-562.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.-J. und Sambrook, J. (1989). *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. Cell *57*, 1223-1236.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A. und Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. Biochem Biophys Res Comm 279, 445-450.
- Oliver, J., Jungnickel, B., Görlich, D., Rapoport, T. und High, S. (1995). The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum. FEBS Lett *362*, 126-130.
- Ooi, C. E. und Weiss, J. (1992). Bidirectional movement of a nascent polypeptide across microsomal membranes reveals requirements for vectorial translocation of proteins. Cell *71*, 87-96.
- Osborne, A. R., Rapoport, T. A. und van den Berg, B. (2005). PROTEIN TRANSLOCATION BY THE SEC61/SECY CHANNEL. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21, 529-550.
- Ou, W.-J., Cameron, P. H., Thomas, D. Y. und Bergeron, J. J. M. (1993). Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. Nature *364*, 771-776.
- Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., Welch, W. J. und Fink, A. L. (1993). ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K+ but not ATP hydrolysis. Nature *365*, 664-666.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. Cell *81*, 561-570.
- Park, J., Easton, D., Chen, X., MacDonald, I. J., Wang, X.-Y. und Subjeck, J. (2003). The chaperoning properties of mouse Grp170, a member of the third family of Hsp70 related proteins. Biochemestry *42*, 14893-14902.
- Peluso, P., Shan, S.-o., Nock, S., Herschlag, D. und Walter, P. (2001). Role of SRP RNA in the GTPase Cycles of Ffh and FtsY. Biochemistry *40*, 15224-15233.
- Perara, E., Rothman, R. E. und Lingappa, V. R. (1986). Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. Science 232, 348-352.
- Perlman, D. und Halvorson, H. O. (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. J Mol Biol *167*, 391-409.
- Pilon, M., Romisch, 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, 3455-3473.
- Pilon, M., Schekman, R. und Römisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. EMBO J *16*, 4540-4548.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J. und Rapoport, T. A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. Cell *94*, 795-807.
- Plath, K. und Rapoport, T. A. (2000). Spontaneous Release of Cytosolic Proteins from Posttranslational Substrates before their Transport into the Endoplasmic Reticulum. J Cell Biol 151, 167-178.
- Plath, K., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J. und Rapoport, T. A. (2004). Interactions between Sec Complex and Prepro-{alpha}-Factor during Posttranslational Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum. Mol Biol Cell *15*, 1-10.

- Plemper, R., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. und Wolf, D. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. Nature (Lond) *388*, 891-895.
- Pool, M. R., Stumm, J., Fulga, T. A., Sinning, I. und Dobberstein, B. (2002). Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. Science *297*, 1345-1348.
- Potter, M. D. und Nicchitta, C. V. (2000). Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem 275, 33828-33835.
- Potter, M. D. und Nicchitta, C. V. (2002). Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. J Biol Chem 277, 23314-23320.
- Potter, M. D., Seiser, R. M. und Nicchitta, C. V. (2001). Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. Trends Cell Biol *11*, 112-115.
- Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C. und Pastan, I. (1977). Induction of two transformationssensitive membrane polypeptides in nomal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose depribation. Cell *11*, 941-947.
- Powers, T. und Walter, P. (1995). Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. Science *269*, 1422-1424.
- Powers, T. und Walter, P. (1996). The nascent polypeptide-assciated complex modulate interactions between the signal recognition particle and the ribosome. Curr Biol *6*, 331-338.
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T. A., Hartmann, E. und Kalies, K.-U. (2000). Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. EMBO J *19*, 1900-1906.
- Rabinovich, Y. M. und Kreinin, M. O. (1991). Evidence for non-uniform translation of individual polypeptides in rat liver mitochondria. Biochim Biophys Acta *1089*, 193-206.
- Raden, D., Song, W. und Gilmore, R. (2000). Role of the Cytoplasmic Segments of Sec61{alpha} in the Ribosome-binding and Translocation-promoting Activities of the Sec61 Complex. J Cell Biol *150*, 53-64.
- Randow, F. und Seed, B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. Nat Cell Biol *3*, 891-906.
- Rapiejko, P. und Gilmore, R. (1994). Signal sequence recognition and targeting of ribosomes to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle do not require GTP. Mol Biol Cell *5*, 887-897.
- Rapiejko, P. J. und Gilmore, R. (1997). Empty site forms of the SRP54 and SRa GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. Cell *8*9, 703-713.
- Rassow, J., Voos, W. und Pfanner, N. (1995). Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. Trends Cell Biol *5*, 207-212.
- Römisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M. und Dobberstein, B. (1989). Homology of 54K protein of signal-recognitiom particle, docking protein and two E. coli proteins with putative GTP-binding domains. Nature *340*, 478-482.
- Rose, M. D., Misra, L. M. und Vogel, J. P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. Cell *57*, 1211-1221.
- Rothblatt, J., Deshaies, R., Sanders, S., 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*, 2641-2652.
- Roy, A. und Wonderlin, W. F. (2003). The Permeability of the Endoplasmic Reticulum Is Dynamically Coupled to Protein Synthesis. J Biol Chem *278*, 4397-4403.

- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. und Bukau, B. (1997). Substrate specifity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. EMBO J *16*, 1501-1507.
- Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J. und Bukau, B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. EMBO J 20, 1042-1050.
- Rutkowski, D. T. und Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. Trends Cell Biol *14*, 20-28.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J. und Silver, P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *E. coli* heat shock protein. J Cell Biol *109*, 2665-2675.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition edn (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, S. und Schekman, R. (1992). Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem 267, 13791-13794.
- Sanders, S., Whitfield, K., Vogel, J., Rose, M. und Schekman, R. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. Cell *69*, 353-365.
- Saris, N., Holkeri, H., Craven, R. A., Stirling, C. J. und Makarov, M. (1997). The Hsp70 homologue Lhs1p is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat-denaturated protein aggregates. J Cell Biol *137*, 813-824.
- Savitz, A. J. und Meyer, D. I. (1990). Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. Nature *346*, 540-544.
- Savitz, A. J. und Meyer, D. I. (1993). 180-kD ribosome receptor is essential for both ribosome binding and protein translocation. J Cell Biol *120*, 853-863.
- Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. und Silver, P. (1995). A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. J Cell Biol *129*, 979-988.
- Schlenstedt, G. und Zimmermann, R. (1987). Import of prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. EMBO J 6, 699-703.
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. und Christen, P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. Science *263*, 971-973.
- Schmidt, B. Z. und Perlmutter, D. H. (2005). Grp78, Grp94, and Grp170 interact with alpha1-antitrypsin mutants that are retained in the endoplasmic reticulum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289, G444-455.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. und Herzog, V. (2000). Cholera Toxin Is Exported from Microsomes by the Sec61p Complex. J Cell Biol *148*, 1203-1212.
- Schwartz, T. und Blobel, G. (2003). Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. Cell *112*, 793-803.
- Scidmore, M., Okamura, H. und Rose, M. (1993). Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell *4*, 1145-1159.
- Shan, S.-o. und Walter, P. (2003). Induced nucleotide specificity in a GTPase. PNAS *100*, 4480-4485.
- Shan, S.-o. und Walter, P. (2004). Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. FEBS Lett *579*, 921-926.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. und Prywes, R. (2002a). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. Dev Cell.

- Shen, Y. und Hendershot, L. M. (2005). ERdj3, a Stress-inducible Endoplasmic Reticulum DnaJ Homologue, Serves as a CoFactor for BiP's Interactions with Unfolded Substrates. Mol Biol Cell *16*, 40-50.
- Shen, Y., Meunier, L. und Hendershot, L. M. (2002b). Identification and Characterization of a Novel Endoplasmic Reticulum (ER) DnaJ Homologue, Which Stimulates ATPase Activity of BiP in Vitro and Is Induced by ER Stress. J Biol Chem *277*, 15947-15956.
- Siegel, V. und Walter, P. (1985). Elongation arrest is not a prerequisite for secretory protein translocation across the microsomal membrane. J Cell Biol *100*, 1913-1921.
- Siegel, V. und Walter, P. (1986). Removal of the Alu structural domain from signal recognition particle leaves its protein translocation activity intact. Nature *320*, 81-84.
- Siegel, V. und Walter, P. (1988). Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP. Cell *52*, 39-49.
- Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics *122*, 19-27.
- Silberstein, S. und Gilmore, R. (1996). Biochemistry, moecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. FASEB J *10*, 849-858.
- Silberstein, S., Schlenstedt, G., Silver, P. A. und Gilmore, R. (1998). A role for the Dnaj homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. J Cell Biol *143*, 921-933.
- Silver, P. A. und Way, J. C. (1993). Eukaryotic DnaJ homologues and the specificity of Hsp70 activity. Cell *74*, 5-6.
- Simon, S., Peskin, C. S. und Oster, G. F. (1992). What drives the translocation of proteins? Proc Natl Acad Sci USA *89*, 3770-3774.
- Simon, S. M. und Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. Cell *65*, 371-380.
- Simons, J., Ferro-Novick, S., Rose, M. und Helenius, A. (1995). BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. J Cell Biol *130*, 41-49.
- Simpson, J. C., Roberts, L. M., Römisch, K., Davey, J., Wolf, D. H. und Lord, J. M. (1999). Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. FEBS Letters *459*, 80-84.
- Skowronek, M. H., Rotter, M. und Haas, I. G. (1999). Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. Biol Chem *380*, 1133-1138.
- Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitsu, K., Madden, B., McCormick, D. J. und Toft, D. O. (1993). Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60 which interacts with hsp90 and hsp70. Mol Cell Biol *13*, 869-876.
- Snapp, E. L., Reinhart, G. A., Bogert, B. A., Lippincott-Schwartz, J. und Hegde, R. S. (2004). The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. J Cell Biol *164*, 997-1007.
- Song, W., Raden, D., Mandon, E. C. und Gilmore, R. (2000). Role of Sec61a in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. Cell *100*, 333-343.
- Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P. und Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. EMBO J *23*, 1008-1019.
- Steel, G. J., Fullerton, D. M., Tyson, J. R. und Stirling, C. J. (2004). Coordinated activation of Hsp70 chaperones. Science *303*, 98-101.
- Steffen, C. (1999). PCR application manual. Roche Molecular Biochemicals, 2<sup>nd</sup> edition.).

- Stephens, S. B., Dodd, R. D., Brewer, J. W., Lager, P. J., Keene, J. D. und Nicchitta, C. V. (2005). Stable Ribosome Binding to the Endoplasmic Reticulum Enables Compartmentspecific Regulation of mRNA Translation. Mol Biol Cell *16*, 5819-5831.
- Stirling, C., 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*, 129-142.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol *185*, 60-89.
- Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H. und Itakura, K. (1981). Use of Synthetic Oligonucleotides as Hybridization Probes: Isolation of Cloned cDNA Sequences for Human {beta} 2-microglobulin. PNAS *78*, 6613-6617.
- Suh, W.-C., Burkholder, W. F., Lu, C. Z., Zhao, X., Gottesman, M. E. und Gross, C. A. (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. Proc Natl Acad Sci USA *95*, 15223-15228.
- Suh, W.-C., Lu, C. Z. und Gross, C. A. (1999). Structural features required for the interaction of the hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. J Biol Chem 274, 30534-30539.
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U. und Flanagan, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. EMBO J *15*, 408-417.
- Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B. und Hartl, F. U. (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of Escherichia coli hsp70 system-DnaK, DnaJ, and GrpE. Proc Natl Acad Sci USA *91*, 10345-10349.
- Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wüthrich, K. (1994). NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. Proc Natl Acad Sci USA *91*, 11343-11347.
- Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V. L. und Walter, P. (1986). The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. J Cell Biol *103*, 1167-1178.
- Tazawa, S., Unuma, M., Tondokoro, N., Asano, Y., Ohsumi, T., Ichimura, T. und Sugano, H. (1991). Identification of a membrane protein responsible for ribosome binding in rough microsomal membranes. J Biochem (Tokyo) 109, 89-98.
- Thomas, Y., Bui, N. und Strub, K. (1997). A truncation in the 14 kDa protein of the signal recognition particle leads to tertiary structure changes in the RNA and abolishes the elongation arrest activity of the particle. Nucl Acids Res *25*, 1920-1929.
- Thrift, R., Andrews, D., Walter, P. und Johnson, A. (1991). A nascent membrane protein is located adjacent to ER membrane proteins throughout its integration and translation. J Cell Biol *112*, 809-821.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I. und Rapoport, T. A. (2001). Protein Disulfide Isomerase Acts as a Redox-Dependent Chaperone to Unfold Cholera Toxin. Cell *104*, 937-948.
- Tsai, J. und Douglas, M. G. (1996). A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. J Biol Chem *271*, 9347-9354.
- Tu, B. P. und Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. J Cell Biol *164*, 341-346.
- Tyedmers, J., Brunke, M., Lechte, M., Sandholzer, U., Dierks, T., Schlotterhose, P., Schmidt, B. und Zimmermann, R. (1996). Efficient folding of firefly luciferase after transport into mammalian microsomes in the absence of luminal chaperones and folding catalysts. J Biol Chem *27*, 19509-19513.

- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M. H., Haas, I. G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. Proc Natl Acad Sci USA 97, 7214-7721 7219.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J. und Zimmermann, R. (2003). Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. EMBO Reports *4*, 505-510.
- Tyedmers, J. D., Universität des Saarlandes. (2001) Zur Rolle von Hsp40- und Hsp70-Chaperonen beim Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum des Säugers. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Tyson, J. R. und Stirling, C. J. (2000). LHS1 and SIL1 provide a lumenal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. EMBO J *19*, 6440-6452.
- van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. und Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *427*, 36-44.
- Verner, K. und Schatz, G. (1988). Protein tranlocation across membranes. Science 241, 1307.
- 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*, 1885-1895.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. und Rapoport, T. A. (1996). Signal sequencedependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol *134*, 25-35.
- Volkmer, J., Guth, S., Nastainczyk, W., Knippel, P., Klappa, P., Gnau, V. und Zimmermann, R. (1997). Pancreas specific protein disulfide isomerase, PDIp, is in transient contact with secretory proteins during late stages of translaocation. FEBS Lett *406*, 291-295.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. J Mol Biol 184, 99-105.
- von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Res *14*, 4683-4690.
- Wall, D., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1994). The N-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate ATPase activity of DnaK and are sufficient for  $\lambda$  replication. J Biol Chem 269, 5446-5451.
- Wall, D., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1995). The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. J Biol Chem *270*, 2139-2144.
- 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 USA 77, 7112-7116.
- 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*, 557-561.
- 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 proteins. J Cell Biol *91*, 551-665.
- Walter, P. und Blobel, G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature *299*, 691-698.
- 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*, 545-550.
- Wang, T. F., Chang, J. H. und Wang, C. (1993). Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. J Biol Chem 268, 26049-26051.
- Wang, X. und Johnsson, N. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates Sec63p to stimulate the assembly of the endoplasmic reticulum protein translocation apparatus. J Cell Sci *118*, 723-732.
- Wanker, E. E., Sun, Y., Savitz, A. J. und Meyer, D. I. (1995). Functional characterization of the 180-kD ribosome receptor in vivo. J Cell Biol *130*, 29-39.
- Watts, C., Wickner, W. und Zimmermann, R. (1983). M13 procoat and a preimmunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. Proc Natl Acad Sci USA *80*, 2809-2813.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem 244, 4406-4412.
- Welch, W., Garrels, J., Thomas, G., Lin, J. und Feramisco, J. (1983). Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca2+-ionophore- regulated proteins. J Biol Chem *258*, 7102-7111.
- Wessel, D. und Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergent and lipids. Anal Biochem *138*, 141-143.
- Whitley, P., Grahn, E., Kutay, U., Rapoport, T. A. und von Heijne, G. (1996). A 12-residuelong polyleucine is sufficient to anchor synaptobrevin to the endoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem *271*, 7583-7586.
- Wiech, H., Sagstetter, M., Müller, G. und Zimmermann, R. (1987). The ATP requiring step in assembly of M13 procoat protein into microsomes is related to preservation of transport competence of the precursor protein. EMBO J *6*, 1011-1016.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A. und Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. Nature *370*, 434-440.
- Wiedmann, M., Goerlich, D., Hartmann, E., Kurzchalia, T. V. und Rapoport, T. A. (1989). Photocrosslinking demonstrates proximity of a 34 kDa membrane protein to different portions of preprolactin during translocation through the endoplasmic reticulum. FEBS Lett 257, 263-268.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T. V., Hartmann, E. und Rapoport, T. A. (1987). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. Nature *328*, 830-833.
- Willer, M., Jermy, A. J., Steel, G. J., Garside, H. J., Carter, S. und Stirling, C. J. (2003a). An in Vitro Assay Using Overexpressed Yeast SRP Demonstrates that Cotranslational Translocation Is Dependent upon the J-Domain of Sec63p. Biochemistry 42, 7171-7177.
- Willer, M., Jermy, A. J., Young, B. P. und Stirling, C. J. (2003b). Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane. Yeast *20*, 133-148.
- Wilson, C. M., Farmery, M. R. und Bulleid, N. J. (2000). Pivotal role of calnexin and mannose trimming in regulating the endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain. J Biol Chem 275, 21224-21232.
- Wilson, D. N., Blaha, G., Connell, S. R., Ivanov, P. V., Jenke, H., Stelzl, U., Teraoka, Y. und Nierhaus, K. H. (2002). Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. Curr Protein Pept Sci 3, 1-53.
- Winkeler, A., Godderz, D., Herzog, V. und Schmitz, A. (2003). BiP-dependent export of cholera toxin from endoplasmic reticulum-derived microsomes. FEBS Lett *554*, 439-442.
- Wirth, A., Jung, M., Frien, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R. und Wagner, R. (2003). The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. Mol Cell *12*, 261-268.

- Wittke, S., Dunnwald, M., Albertsen, M. und Johnsson, N. (2002). Recognition of a Subset of Signal Sequences by Ssh1p, a Sec61p-related Protein in the Membrane of Endoplasmic Reticulum of Yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell *13*, 2223-2232.
- Wittke, S., Dunnwald, M. und Johnsson, N. (2000). Sec62p, A Component of the Endoplasmic Reticulum Protein Translocation Machinery, Contains Multiple Binding Sites for the Sec-Complex. Mol Biol Cell *11*, 3859-3871.
- Wolin, S. und Walter, P. (1988). Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. EMBO J 7, 3559-3569.
- Wolin, S. und Walter, P. (1989). Signal recognition particle mediates a transient elongation arrest of preprolactin in reticulocyte lysate. J Cell Biol *109*, 2617-2622.
- Woolhead, C. A., McCormick, P. J. und Johnson, A. E. (2004). Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. Cell *116*, 725-736.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene *33*, 103-119.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. und Mori, K. (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. Cell *107*, 881-891.
- Young, B. P., Craven, R. A., Reid, P. J., Willer, M. und Stirling, C. J. (2001). Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. EMBO J *20*, 262-271.
- Yu, M., Haslam, R. H. A. und Haslam, D. B. (2000). HEDJ, an Hsp40 Co-chaperone Localized to the Endoplasmic Reticulum of Human Cells. J Biol Chem *275*, 24984-24992.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W., Gragerov, A. und Ogata, C. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molekular chaperone DnaK. Science *272*, 1606-1614.
- Ziegelhoffer, T., Lopez-Buesa, P. und Craig, E. A. (1995). The Dissociation of ATP from hsp70 of Saccharomyces cerevisiae Is Stimulated by Both Ydj1p and Peptide Substrates. J Biol Chem *270*, 10412-10419.
- Zimmermann, R. und Meyer, D. I. (1986). 1986: a year of new insights into how proteins cross membranes. Trends Biochem Sci *11*, 512-515.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M. J. und Pelham, H. R. B. (1988). Seventykilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. EMBO J *7*, 2875-2880.
- Zimmermann, R., Zimmermann, M., Mayinger, P. und Klappa, P. (1991). Photoaffinity labeling of dog pancreas microsomes with 8-azido-ATP inhibits association of nascent preprolactin with the signal sequence receptor complex. FEBS Lett *286*, 95-99.
- Zupicich, J., brenner, S. E. und Skarnes, W. C. (2001). Computational prediction of membrane-tethered transcription factors. Genome Biol *2*, 1-6.

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich zuerst Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Für die intensive Betreuung, für seine Geduld und stete Gesprächsbereitschaft bin ich ihm sehr dankbar.

Prof. Dr. Manfred Schmitt danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Anika Müller bedanke ich mich herzlich für ihre engagierte Unterstützung bei meinen experimentellen Arbeiten, für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft auch dabei, mich immer mal wieder nach Hause zu fahren. Frau Monika Lerner möchte ich für ihre Einführung in "die Welt des Pipettierens" danken.

Herrn Dr. Patrick Maurer danke ich für die Herstellung von Plasmiden und Herrn Dr. Wolfgang Nastainczyk für die Herstellung von Antikörpern und Peptiden.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Graduiertenkolleg 377 und dem SFB 530.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Richard Zimmermann und PD Dr. Gabriel Schlenstedt bedanke ich mich für das überaus gute Arbeitsklima und die Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich PD Dr. Martin Jung und Dr. Markus Greiner für ihre Unterstützung und ihre große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Markus, und "der Hefe" Dr. Stefanie Caesar danke ich herzlich für ihre Arbeit beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für ihre Unterstützung und das Interesse, mit dem sie meine Arbeit von Spanien aus verfolgt haben, danke ich meiner Familie sehr.

Zuletzt möchte ich von Herzen meinem Eheman Oliver für die motivierende Unterstützung meiner Arbeit, für seine Geduld und für den Halt und die Ermutigung in schwierigen Phasen danken.