

**Untersuchungen zur Proteintranslokation in psychrophilen  
Prokaryonten und zur Rolle von Sec61p in der  
ER-assoziierten Degradation in *Saccharomyces cerevisiae***

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

von

**Dipl.-Biol. Thomas Tretter**

Saarbrücken

2. November 2014

Tag des Kolloquiums:	10. Oktober 2014
Dekan:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Berichterstatter:	Prof. Dr. Karin Römisch Prof. Dr. Richard Zimmermann
Vorsitz:	Prof. Dr. Uwe Walldorf
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. Frank Hannemann

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis .....	1
II. Abkürzungsverzeichnis.....	4
III. Abstract (english) .....	7
IV. Zusammenfassung (deutsch).....	8
V. Einleitung .....	9
V.1 Der Sec61-Komplex und der sekretorische Weg .....	9
V.2 Zwei Formen der Proteintranslokation ins Hefe-ER .....	10
V.3 Die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) und die ER-assoziierte Degradation (ERAD) .....	13
V.4 CPY*, KHN, KWW, Deg1:Sec62p und ERAD .....	17
V.5 Die Unfolded Protein Response (UPR).....	19
V.6 Proteinmodifikationen: N-Acetylierung und Ubiquitinierung .....	20
V.7 N-Degrans und Proteinstabilität .....	22
V.8 Die unterschiedlichen Klassen prokaryontischer Signalpeptide und der bakterielle Translokationskomplex .....	23
V.9 Die Insertion von Transmembranproteinen.....	24
V.10 Anpassung psychrophiler Organismen an ihre Umgebung .....	25
V.11 Bekannte Mutationen in Sec61-Homologen .....	26
VI. Material und Methoden.....	28
VI.1 Geräte .....	28
VI.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
VI.3 Chemikalienliste .....	30
VI.4 Hefestämme .....	31
VI.5 Plasmide.....	34
VI.6 Primer .....	35
VI.7 Antikörper .....	38
VI.8 Screening nach neuen Mutanten und der Colony-Blot zur Detektion möglicher ERAD-Defekte .....	38
VI.9 Bioinformatische Methoden .....	41
VI.9.1 Datensets zur Untersuchung psychrophiler Eubacteria bezüglich ihrer Signalpeptide und ihrer Transmembrandomänen.....	41
VI.9.2 Erstellen von Perl-Skripten.....	42
VI.9.3 Vorhersagen mit SignalP 3.0 und HMMTOP 2.0 .....	42
VI.9.4 Grafische Darstellung mit SequenceLogo .....	43
VI.9.5 GRAVY-Analyse.....	43
VI.10 Molekularbiologische Methoden.....	44
VI.10.1 Herstellung hitzekompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	44
VI.10.2 Transformation hitzekompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	44
VI.10.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	44
VI.10.4 Ligation von Plasmid-DNA .....	45
VI.10.5 Restriktion von Plasmid-DNA und Amplikons .....	45
VI.10.6 Ortsgerichtete Mutagenese nach dem Quickchange Protokoll von Stratagene .....	45
VI.10.7 Gelextraktion .....	46
VI.10.8 Präzipitation von pDNA.....	46

VI.10.9	Basische Phenolextraktion zur DNA-Isolation .....	46
VI.10.10	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	47
VI.10.11	Hitzetransformation von Hefen.....	47
VI.10.12	Zufallsmutagenese durch Error-Prone PCR .....	47
<b>VI.11</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>48</b>
VI.11.1	SDS-PAGE und Western-Blot.....	48
VI.11.2	Cycloheximid-Chase .....	49
VI.11.3	Präparation von Hefemikrosomen .....	49
VI.11.4	Herstellung von Ganzzellextrakten aus Hefen.....	50
VI.11.5	TCA-Fällung .....	50
VI.11.6	Lytikasepräparation.....	51
VI.11.7	Säulenchromatografische Aufreinigung der Untereinheiten des Sec-Komplex .....	51
VI.11.8	Tryptischer in-Gel Verdau .....	52
VI.11.9	Anlegen von Glycerolkulturen .....	52
VI.11.10	Droptest.....	53
VI.11.11	UPR- $\beta$ -Galaktosidaseassay .....	53
VI.11.12	<sup>35</sup> S-Pulse-Chase Analyse.....	53
VI.11.13	Pulse Analyse zur Bestimmung der DPAPB-Akkumulation .....	54
VI.11.14	RAMP-Analyse zur strukturellen Integrität des Sec61-Komplex im linearen Sucrosegradienten .....	54
VI.11.15	Untersuchungen zum freien und zum Sec-Komplex Proteinpool .....	55
<b>VII.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>VII.1</b>	<b>Anpassung sekretorischer Signalpeptide und Transmembrandomänen in ihrer Funktion bei niedrigen Temperaturen.....</b>	<b>57</b>
VII.1.1	Konservierte Bereiche in SecY-Homologen aus psychophilen und mesophilen Eubacteria.....	57
VII.1.2	Die Signalpeptidlängen ähneln sich bei mesophilen und psychophilen Eubacteria .....	59
VII.1.3	Die Signalpeptide der Psychophilen sind nicht hydrophober als diejenigen der Mesophilen.....	60
VII.1.4	Detaillierte Analyse der AS-Zusammensetzung .....	64
VII.1.5	Extremophile exprimieren weniger sekretorische Proteine als ihr mesophiles Gegenstück .....	68
VII.1.6	Untersuchungen zu den Transmembrandomänen psychrophiler Eubacteria. ....	69
<b>VII.2</b>	<b>Die N-Acetylierung und Auswirkungen des Verlust auf Vitalität, Proteintranslokation und ERAD.....</b>	<b>73</b>
VII.2.1	Aufreinigung und N-Acetylierungen der Untereinheiten des Sec-Komplex ...	73
VII.2.2	Effekte der NatA-Deletion auf Vitalität und Proteintranslokation in Hefen .....	75
VII.2.3	Stabilität von Sec62p, Sec61p und Sbh1p bei Verlust der N-Acetylierung ....	77
VII.2.4	Verlust der N-Acetylierung von Sec61p und dessen Auswirkung auf Proteintranslokation und ERAD .....	79
VII.2.5	CPY*-Degradation in sec61S2Y-Hefen .....	80
<b>VII.3</b>	<b>Rationales Design bekannter Mutanten und deren Effekte auf ERAD .....</b>	<b>83</b>
VII.3.1	Alignment von Sec61-Homologen zur Identifikation Punktmutationen .....	83
VII.3.2	Diabetes und die sec61Y345H-Mutation .....	84
VII.3.3	Vitalität, Precursorakkumulation und Degradationsdefekte in sec61P50S- und sec61F311Y-Hefen .....	89
VII.3.4	Die Mutation sec61M450N, Eine neue Variante einer altbekannten Mutation im hydrophoben Ring .....	91
<b>VII.4</b>	<b>Zufallsmutagenese in ausgewählten Bereichen von Sec61p .....</b>	<b>93</b>
<b>VII.5</b>	<b>Eine neue kältesensitive Mehrfachmutante mit Defekten im posttranslationalen Import .....</b>	<b>96</b>

<b>VII.6 Charakterisierung von <i>sec61ΔL7</i>-Hefen</b> .....	<b>99</b>
VII.6.1 Einfluss der Deletion von Loop 7 auf Vitalität, Translokation und Degradation .....	99
VII.6.2 Untersuchungen zur Degradation von KHN, KWW und Deg1:Sec62p in <i>sec61ΔL7</i> -Hefen .....	104
VII.6.3 Der Verlust von Loop 7 führt zu einer Instabilität des Sec61-Komplex.....	108
VII.6.4 Loop 7 vermittelt Sec61p in die freie Fraktion.....	110
<b>VII.7 Die Mutationen im zusammenfassenden Überblick.....</b>	<b>112</b>
<b>VIII. Diskussion.....</b>	<b>113</b>
<b>VIII.1 Proteintranslokation über Membranen in extremen Habitaten .....</b>	<b>113</b>
<b>VIII.2 N-Acetylierung der N-Termini von Sec61p und Sec62p.....</b>	<b>116</b>
<b>VIII.3 Die Mehrfachmutante <i>sec61EP</i> als Resultat des Screening in ausgewählten Bereichen .....</b>	<b>117</b>
<b>VIII.4 Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise von <i>SEC61</i> durch die Mutante <i>sec61ΔL7</i>.....</b>	<b>119</b>
<b>VIII.5 Übersicht Tabellen.....</b>	<b>125</b>
<b>VIII.6 Übersicht Abbildungen .....</b>	<b>128</b>
<b>IX. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

#	Anzahl
(w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Immunoglobulin binding protein
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cdc48	<i>engl.: Cell division cycle 48</i>
CHX	Cycloheximid
COOH	Carboxygruppe
CPY	Carboxypeptidase Y
CPY*	Carboxypeptidase Y*
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
Der1	Degradation in the ER 1
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Doa10	Degradation of Mat-α2-10
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	<i>engl.: Enhanced chemiluminescence</i>
EDEM	<i>engl.: ER degradation-enhancing α-mannosidase-like lectins</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP-PCR	Error-Prone-PCR
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
ERQC	ER-Qualitätskontrolle
Et al.	<i>et altera</i> (dt.: und andere)
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde

HA	Hämagglutinin
HERP	homoCys-responsive ER-resident protein
Hrd1p	HMG-CoA Reduktase degradation 1
HRP	Horseradish Peroxidase
Hsp	Heat Shock Protein
Htm1p	Homolog zu Mannosidase 1
IP	Immunpräzipitation
KAc	Kaliumacetat
Kar2p	Karyogamy 2-Protein
kb	kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KRY	Karin Römisch Yeast
l	Liter
L7	Loop 7
L8	Loop 8
LB	Luria Bertani
LEU2	Leucin 2
LiAc	Lithiumacetat
M	molar
mA	Milliampere
mCPY	reife Form von CPY
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	<i>engl.: major histocompatibility complex</i>
mH <sub>2</sub> O	Milliporewasser
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MP	Milchpulver
NaOH	Natriumhydroxid
Ng	Nanogramm
NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OST	Oligosaccharyl Transferase
P1-CPY	erste Proform von CPY
P2-CPY	zweite Proform von CPY
PCR	<i>engl.: Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Proteindisulfid Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
pGal	Galaktose-Promotor
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PNGase	Protein-N-Glykanase
POX	Peroxidase
PpaF	Präpro-alpha-Faktor
PRC1	Proteinregulator der Zytokinese 1
RNC	Ribosome nascent chain

rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
Sbh1p	Sec61 $\beta$ -Homolog
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dt.: Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde(n)
sog	sogenannte(s/r)
SP	Signalpeptidase
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signal recognition particle
Sss1	Sec61 suppressor
T	Thymin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	Twin-Arginin-Transporter
TBS	<i>engl.: Tris buffered saline</i>
TCA	<i>engl.: trichloric acid</i> (dt.: Trichlorsäure)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tween20	Polyethylensorbitanmonolaureat
U	Unit(s)
Ub	Ubiquitin
UPR	<i>engl.: Unfolded protein response</i>
UPRE	<i>engl.: Unfolded protein response element</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose
z. b.	zum Beispiel

### III. Abstract (english)

One of the most impressive environments bacteria settled in is the extreme cold. Little is known about adaptation of cold-sensitive cell biological processes. In this thesis, I present a genome-wide analysis of several psychrophilic, mesophilic and thermophilic bacteria to identify structural changes in classic signal peptides, Tat signal peptides, lipoprotein signal peptides and transmembrane domains to the cold. The most striking difference was that psychrophile signal peptides and transmembrane domains contained higher percentages of Ile compared to mesophiles.

Sec61p is a multiple transmembrane protein that forms a channel in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER). The pore is responsible for the import of soluble precursor proteins and for the insertion of membrane proteins. Furthermore, Sec61p of *S. cerevisiae* is a candidate for the export channel in a process named ERAD. In this thesis, I examined the role of the N-terminus and established the *sec61S2Y* mutant, defective for N-acetylation, posttranslational translocation and ERAD. I analyzed the *sec61Y345H* mutant, whose homolog in Mice causes diabetes and I identified a vital *sec61* mutant lacking loop 7 in a new screen. A complete deletion of Loop 7 results in strong defects for its posttranslational protein import of soluble proteins in the ER and in the ERAD of soluble substrates.

## IV. Zusammenfassung (deutsch)

Eine der beeindruckendsten Umwelten, die von Bakterien besiedelt werden ist die extreme Kälte. Nur wenig ist bekannt über die Anpassung von kältesensitiven, zellbiologischen Prozessen. In dieser Arbeit, präsentiere ich eine genomweite Analyse von psychophilen, mesophilen und thermophilen Bakterien zur Identifikation struktureller Änderungen von klassischen Signalpeptiden, Tat-Signalpeptiden, Lipoproteinsignalpeptiden und Transmembrandomänen zur Anpassung an die Kälte. Der größte Unterschied ist, dass psychophile Signalpeptide und Transmembrandomänen höhere Anteile an Ile beinhalten verglichen mit mesophilen.

Sec61p ist ein mehrfach transmembranes Protein, dass einen Kanal in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bildet. Es ist die Pore, die für den Import löslicher Vorläuferproteine und für die Insertion von Transmembrandomänen verantwortlich ist. Außerdem ist Sec61p von *S. cerevisiae* ein Kandidat für den Exportkanal in einem Prozess, der als ERAD bezeichnet wird. In dieser Arbeit untersuchte ich den N-Terminus und etablierte die *sec61S2Y*-Mutante, die defekt für die N-Acetylierung, posttranslationale Translokation und ERAD ist. Ich untersuchte die Mutante *sec61Y345H* in Hefe, deren Homolog in Mäusen Diabetes auslöst und identifizierte in einem neuen Screen eine vitale *sec61*-Mutante ohne Loop 7. Eine vollständige Deletion von Loop 7 führt zu starken Defekten im posttranslationalen Proteinimport von löslichen Proteinen ins ER und in ERAD von löslichen Substraten.

## V. Einleitung

### V.1 Der Sec61-Komplex und der sekretorische Weg

Proteine werden im Cytoplasma der Zelle synthetisiert, verbleiben dort oder werden über den sekretorischen Weg in die unterschiedlichen Kompartimente der Zelle oder in den Extrazellulärraum transportiert (Johnson und van Waes, 1999). Dieser Weg ist in seinen Grundbestandteilen von der Hefe bis zum Menschen stark konserviert (Johnson und van Waes, 1999; Kienle *et al.*, 2009). Zu Beginn bildet der trimere Sec61-Komplex (bestehend aus Sec61p, Sbh1p und Sss1p in Hefe) eine Pore, die dem Vorläuferprotein den Übergang vom Cytosol ins ER-Lumen ermöglicht (Gorlich und Rapoport, 1993). Dieser Prozess wird als Translokation bezeichnet.

Sec61p ist ein Protein mit 10 Transmembrandomänen, dessen N- und C-Terminus im Cytosol lokalisiert sind (Wilkinson *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 2004). Die 10 Transmembrandomänen sind über lumenale bzw. cytosolische Loops miteinander verbunden (Wilkinson *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 2004). Sbh1p ist ein 82 AS großes Transmembranprotein, dessen N-Terminus ebenfalls im Cytoplasma liegt und dessen C-Terminus im ER-Lumen verweilt (van den Berg *et al.*, 2004). Sss1p ist ein 9 kDa großes transmembranes Protein, dessen Depletion zu schwerwiegenden post- und cotranslationalen Defekten führt (Esnault *et al.*, 1993; Falcone *et al.*, 2011). Es ist ein integrales und einfach membrandurchdringendes Membranprotein, dessen langer N-Terminus dem Cytosol zugewandt ist und dessen kurzer C-Terminus dem ER-Lumen zugewandt ist (Falcone *et al.*, 2011). Die Funktion von Sss1p ist nicht vollständig verstanden, es scheint aber als eine Art „Klemme“ für die Stabilisierung des trimeren Komplex verantwortlich zu sein (Esnault *et al.*, 1993; van den Berg *et al.*, 2004).

Der Sec61-Komplex kann mit dem heterotetrameren Sec63-Komplex aus Sec62p, Sec63p, Sec66/71p und Sec72p zum heptameren Sec-Komplex assoziieren (Abbildung 1; Rothblatt *et al.*, 1989; Deshaies *et al.*, 1991). Funktionale Homologe von Sec61p, Sbh1p und Sss1p (in Säugern: Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$ , Sec61 $\gamma$  und in *E. coli*: SecY, SecE und SecG) sind ubiquitär verbreitet. Insbesondere die Homologe von Sec61p und Sss1p sind hoch konserviert (Valcarcel *et al.*, 1999).

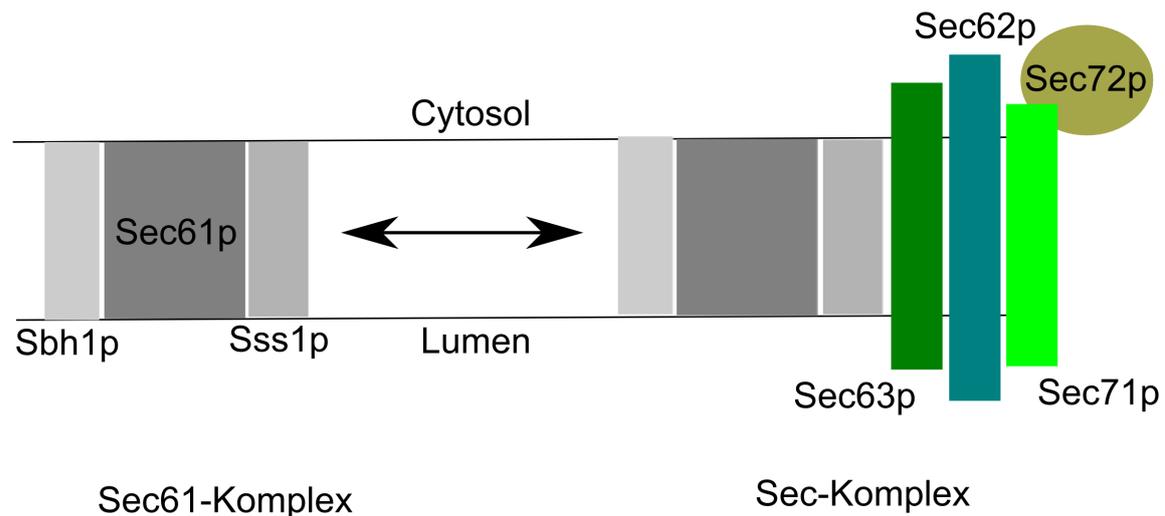


Abbildung 1: Schematische Darstellung des co- und posttranslationalen Translokationskomplexes. Der Sec61-Komplex (Sec61p, Sss1p, Sbh1; grau) assoziiert mit dem tetrameren Sec63-Komplex (grün) aus Sec62p, Sec63p, Sec66/71p und Sec72p zum Sec-Komplex.

## V.2 Zwei Formen der Proteintranslokation ins Hefe-ER

Der Signalthypothese nach besitzen die Proteine des sekretorischen Wegs eine N-terminale Erweiterung, die den Bestimmungsort des Proteins definiert, das sogenannte Signalpeptid oder die Signalsequenz (Blobel und Sabatini, 1971; Blobel und Dobberstein, 1975). Diese ist in drei Domänen strukturiert: dem N-Terminus am nächsten gelegen befindet sich die nettopositive N-Domäne, dann die hydrophobe H-Domäne und C-terminal die polare C-Domäne mit der Konsensuspaltstelle für die Signalpeptidase, die das Signalpeptid letztendlich entfernt (von Heijne, 1985; von Heijne, 1990).

Der Sec61- und Sec-Komplex ermöglichen unterschiedliche Formen der Proteintranslokation ins ER: lösliche Proteine wie der Vorläufer des Mating-Pheromon  $\alpha$  (PpaF) oder die Carboxypeptidase Y (CPY) werden (i) posttranslational durch den heptameren Sec-Komplex transloziert (Osborne *et al.*, 2005). Der Import findet also erst statt nachdem das Protein vollständig am Ribosom translatiert wurde (Plath *et al.*, 2004). Chaperone der Hsp70-Familie verhindern die verfrühte Faltung der Proteinkette und ermöglichen die Translokation und die Weiterleitung an den Sec62/63-Komplex (de los Rios *et al.*, 2006; Matlack *et al.*, 1999). Das Vorläuferprotein wird dann durch den Brown'schen Ratschenmechanismus über die Membran transferiert indem ein lumeales Hsp70-Chaperon, Kar2p in Hefe (BiP in Säugern), unter ATP-Verbrauch an das Substrat bindet und dieses am Zurückgleiten ins Cytosol hindert (Matlack *et al.*, 1999). Sec61p, Sss1p, Sec62p, und Sec63p sind für die Zelle essentiell (Esnault *et*

*al.*, 1994, Wittke *et al.*, 2000). Transmembrane Proteine, wie DPAPB, werden (ii) cotranslational durch den trimeren Sec61-Komplex über die Membran transloziert (Osborne *et al.*, 2005; Kalies *et al.*, 2005; Levy *et al.*, 2001; Brodsky *et al.*, 1995). Dazu translatiert das Ribosom das Signalpeptid des Vorläuferproteins und arretiert im sog. Ribosome Nascent Chain Complex (RNC; Walter und Johnson, 1994). Dieser Komplex besteht aus der mRNA, dem Ribosom, der naszierenden Kette und SRP (Walter und Johnson, 1994). Nachdem SRP54 die Signalsequenz gebunden hat, wird der RNC zum SRP-Rezeptor (SR) in der ER-Membran geführt und dem Sec61-Komplex unter GTP-Verbrauch übergeben (Keenan *et al.*, 2001). Das Signalpeptid interagiert mit dem Translokationskanal in der Nähe von TMD 2 und 7, öffnet ihn, und das Ribosom beginnt erneut mit der Synthese und schiebt dadurch das verbleibende Protein durch den Sec61p-Kanal (Abbildung 2; Plath *et al.*, 1998).

Welcher der beiden beschriebenen Mechanismen der Translokation bevorzugt wird hängt von der Hydrophobizität des Signalpeptids ab (Ng *et al.*, 1996). Je hydrophober es ist, desto höher die Wahrscheinlichkeit für den cotranslationalen Import und umgekehrt (Ng *et al.*, 1996). In Säugern wird die große Mehrzahl an sekretorischen Proteinen cotranslational transportiert und in Bakterien hauptsächlich posttranslational (Rapoport, 2007; Delic *et al.*, 2013; Lakkaraju *et al.*, 2012). Hefen verwenden beide Mechanismen in ähnlicher Häufigkeit und importieren lösliche Proteine bevorzugt posttranslational bzw. transmembrane Proteine bevorzugt durch SRP (Rapoport, 2007; Delic *et al.*, 2013; Lakkaraju *et al.*, 2012; Ast *et al.*, 2013).

Neben dem Sec61-Komplex existiert der Ssh1-Komplex (Sec sixty-one protein homolog; bestehend aus Ssh1p, Sbh2p und Sss1p), der ausschließlich für cotranslationalen Import verantwortlich ist, aber nur zu 10% des Sec61-Komplex Levels exprimiert wird, und nicht essentiell ist (Brodsky *et al.*, 1995; Prinz *et al.*, 2000; Wittke *et al.*, 2002).

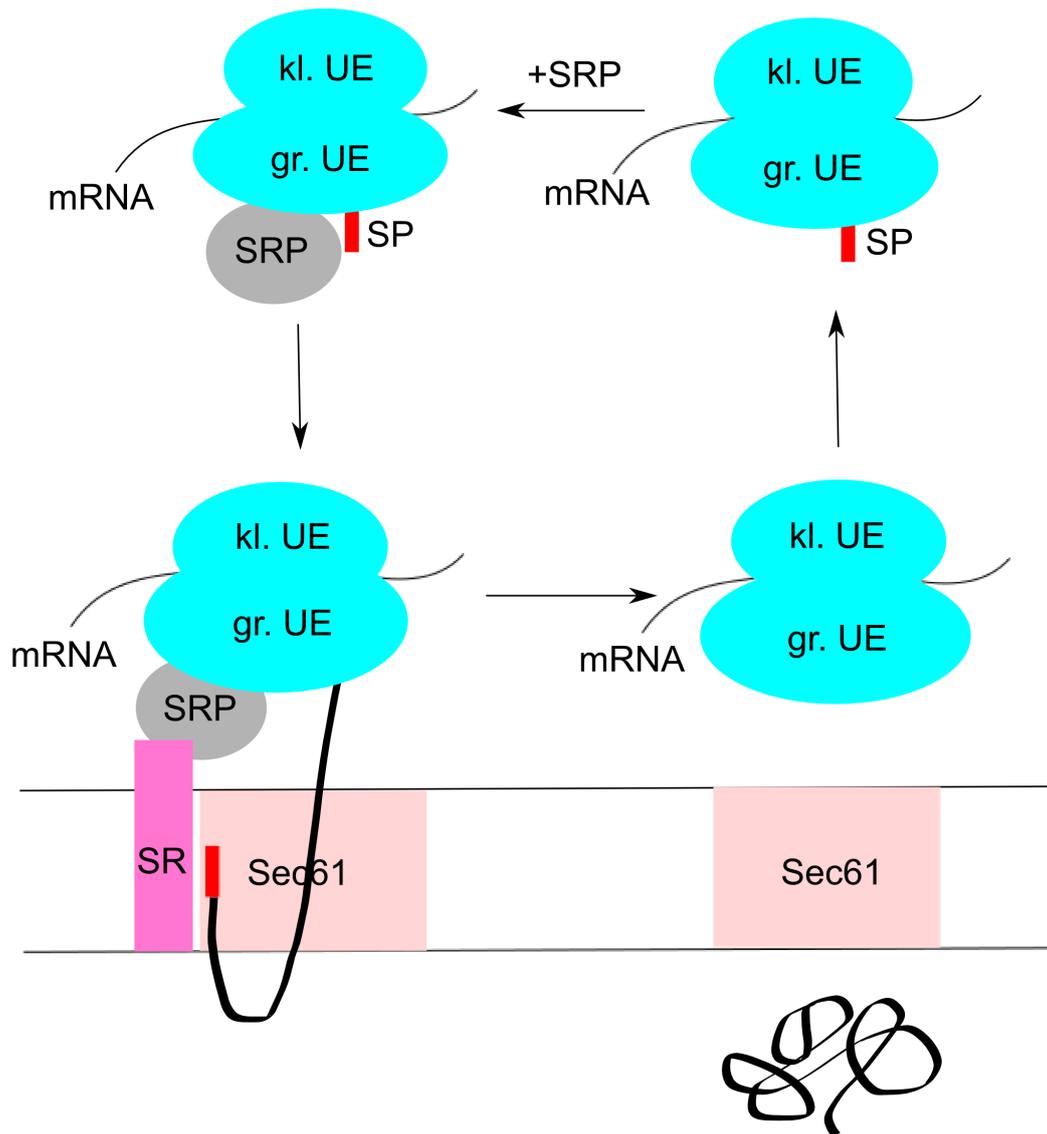


Abbildung 2: Der cotranslationale Import und die Rolle des trimeren Sec61p-Komplex. Das Ribosom assembliert an der mRNA und beginnt mit der Proteinsynthese (oben rechts). Sobald das Signalpeptid translatiert wurden bindet SRP (engl.: signal recognition particle) an das Signalpeptid und das Ribosom arretiert im sogenannten RNC (engl.: ribosome nascent chain complex; oben links). SRP bindet an den SR (SRP-Rezeptor) und führt den RNC zum trimeren Translokation (bestehend aus Sec61p, Sss1p und Sbh1p). Das Signalpeptid bindet an den hydrophoben Kern von Sec61p und das Ribosom nimmt die Translation wieder auf, wodurch die Translokation angetrieben wird (unten links). Nachdem das Protein vollständig ins ER-Lumen transloziert wurde, spaltet die SP I (Signalpeptidase I) das Signalpeptid ab und setzt es damit frei (unten rechts). Angelehnt an Osborne *et al.*, 2005.

Unabhängig vom Translokationsmodus, werden die Proteine danach im ER-Lumen oder gelegentlich während der Translokation modifiziert: Das Signalpeptid wird durch die Signalpeptidase entfernt, durch das oxidative Milieu und PDI werden Disulfidbrücken ausgebildet, Proteine werden N-Glykosyliert und Faltungen durch Chaperone unterstützt (van Anken und Braakman, 2005; Tu und Weissmann, 2004).

Durch Studien mit Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Sec61p mit dem Ribosom durch Loop 8 vermittelt wird (Cheng *et al.*, 2005). In

höheren Säugern spielt Sec61 $\beta$  (Sbh1 in Hefe) eine Rolle in der Ribosomenbindung (Levy *et al.*, 2001). Eine weitere Mutante in Loop 6 stört die Ribosomenbindung nicht, aber den cotranslationalen Transport (Cheng *et al.*, 2005). Von der lumenalen Seite wird der Sec61p-Kanal durch einen Bereich der TMD2 blockiert (van den Berg *et al.*, 2004). Dieser sogenannte Plug muss während der Translokation temporär entfernt werden. Er ist nicht essentiell für die Vitalität der Hefe, aber für eine effiziente Translokation (Junne *et al.*, 2006).

Interessanterweise existiert für Tail Anchor (TA) Proteine ein alternativer posttranslatinaler Insertionsmechanismus durch Get1/2/3p (Hefe) in die ER-Membran (Johnson *et al.*, 2012).

### **V.3 Die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) und die ER-assoziierte Degradation (ERAD)**

Nach der Translokation werden Proteine im ER auf korrekte Faltung und Modifikation kontrolliert (Vembar und Brodsky, 2008). Die Gesamtheit dieser Maßnahmen wird als ER-residente Qualitätskontrolle bezeichnet (ERQC; Vembar und Brodsky, 2008). Proteine, die in dieser Qualitätskontrolle als fehlerhaft erkannt werden, werden in einem Prozess, der als ER-assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet wird, ins Cytosol zurück transportiert und dort durch das Proteasom degradiert (Römisch 2005; McCracken und Brodsky, 1996; Hampton, 2002). Proteine, die erst in späteren Kompartimenten des sekretorischen Wegs erkannt werden, werden in Vesikel verpackt und zurück zum ER transportiert (Hsu *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 1998). Intakte Proteine gelangen über den sekretorischen Weg zu ihrem Bestimmungsort und können da ihre biologische Funktion aufnehmen (Vembar und Brodsky, 2008).

Ursachen für das Entstehen von fehlgefalteten Proteinen können endogene Faktoren, wie Mutationen, aber auch Hitze, oxidative Schäden oder Deamidierung des Proteins sein (Lomas und Parfrey, 2004; Goldberg, 2003). In eukaryontischen Zellen sind ca. 5-30% aller neu translatierten Proteine falsch gefaltet und werden degradiert (Schubert *et al.*, 2000).

Wie schon erwähnt müssen fehlerhafte Proteine zurück ins Cytosol exportiert werden (Römisch, 2005; McCracken und Brodsky, 1996; Hampton, 2002). Für diesen retrograden Transport und die Degradation der Exportsubstrate sind eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren notwendig: Chaperone der Hsp70-Familie (z. B. BiP in Säugern bzw. Kar2p in Hefen) und Pdi1p (PDI in Säugern) halten das Substrat

in einem exportkompetenten Zustand, indem eine Aggregation des Proteins verhindert wird (Gillece *et al.*, 1999; Kabani *et al.*, 2003). Einige Mutationen in Kar2p zeigen Defekte in ERAD und unterbinden eine Aggregation von Proteinen nicht mehr (Plempner *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2005). Lectine (z. B. EDEM1; ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like lectins) binden an Glycanstrukturen und generieren das Signal zum Abbau (Aebi *et al.*, 2010). Proteine durchlaufen so lange den Calnexin/Calreticulin Zyklus bis sie einwandfrei gefaltet sind und zum nächsten Kompartiment des sekretorischen Wegs transportiert werden können (McCracken und Brodsky, 1996). Proteine, die nicht glykosyliert werden, werden durch spezifische Faktoren (z. B. HERP; homoCys-responsive ER-resident protein) erkannt, kontrolliert und zuletzt an das Proteasom vermittelt (Okuda-Shimizu und Hendershot, 2007).

Das zuvor erwähnte Kar2p bindet an den lumenalen Loop von Sec63p und beide sind Bestandteil eines Komplexes aus ER-gebundenen Proteasomen, dem Sec61-Komplex und ERAD-Faktoren (Ng *et al.*, 2007). Doch weder der Sec63-Komplex, noch Sec63p selbst sind notwendig für die Proteasom-Kanal Interaktion (Ng *et al.*, 2007). Chaperone wie Kar2p, Pdip, Cnel1, Ssalp und Mnl1p spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung fehlerhafter Proteine und beim Targeting des fehlerhaften Proteins zum Kanal (Nishikawa *et al.*, 2005; McCracken und Brodsky, 2005).

Auch, wenn einige ERAD-Komponenten identifiziert werden konnten, so wird die Identität des Exportkanals weiterhin kontrovers diskutiert. Es existieren eine Reihe eindeutiger Belege für eine Schlüsselrolle von Sec61p: Einer der ersten Hinweise war, dass die Assoziation von US2 mit der schweren Kette des MHC-Klasse I-Komplexes zu einer verlängerten Interaktion mit Sec61p führt und anschließend zum Abbau der schweren Kette führt (Wiertz *et al.*, 1996). Die Mutante *sec61-302* (D168G, S179P, F263L, S353C) vermindert die Bindung von Proteasomen an rekonstituierte Proteoliposomen (Ng *et al.*, 2007). Die Mutanten *sec61-32* und *sec61-41* sind in einem *in-vitro* ERAD-Assay defekt und das ERAD-Substrat interagiert mit Sec61p (Pilon *et al.*, 1997; Pilon *et al.*, 1998). Die Punktmutation G341E (*sec61-3*) sorgt für einen Defekt in ERAD-L zweier CPY\*-Derivate (OPY\* und DPY\*; Willer *et al.*, 2008).

Bisher ist es nicht gelungen Sec61-Mutanten zu isolieren, welche den Proteinimport ins ER und den Export ins Cytosol voneinander entkoppeln und damit einen eindeutigen Beweis liefern, dass Sec61p den Exportkanal darstellt.

Ein weiterer Kandidat für die Rolle des Exportkanals ist Der1p. Eine Deletion von Der1p beeinträchtigt die Vitalität von Hefen nicht, führt aber zu einer Akkumulation der Carboxypeptidase Y im CHX-Chase (Knop *et al.*, 1996). In einer IP gegen HERP-Proteine wird Der1p, das 26S-Proteasom und ubiquitinierte Substrate gefällt (Vembar and Brodsky, 2008). Außerdem ist ein Szenario denkbar indem Der1p und Sec61p für unterschiedliche ERAD-Substrate den Exportkanal darstellen (Kalies *et al.*, 2005).

Ubiquitin (Ub) ist ein 76 AS großes Protein, das in höheren Eukaryonten und in vielen Prokaryonten (außer *E. coli*) vorkommt (Wang *et al.*, 2001; Plemper und Wolf, 1999). Unter Ubiquitinierung versteht man die kovalente Verknüpfung des Ub-C-Terminus mit der  $\alpha$ -Aminogruppe eines Lysins (Fliermann *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2004). Polyubiquitinketten werden durch kontinuierliches Anfügen weiterer Ub-Monomere an das Lysin48 des am weitesten distalen Ubiquitin formiert (Fliermann *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2004). Anschließend dissoziiert das Substrat durch Polyubiquitinierung durch das E4-Enzym Ufd2p und der ATPase-Aktivität von Cdc48/p97 bzw. der 19S regulatorischen Partikels von der cytosolischen Seite der ER-Membran (Jarosch *et al.*, 2002; Fliermann *et al.*, 2003).

Anschließend wird das ubiquitinierte ERAD-Substrat zum Proteasom geleitet, dort deubiquitiniert, durch PNGasen (Protein-N-Glykanase) deglykosyliert und anschließend dem proteolytischen Kanal zugeführt (Römisch, 2005).

Das Proteasom ist ein 2.4 MDa großer Komplex bestehend aus einer 20S katalytischen Partikel und einem 19S regulatorischen Partikel (Goldberg, 2003). Letzterer vermittelt das Entfalten und die Weiterleitung des Substrats an die 20S katalytische Untereinheit durch seine AAA-ATPase Domänen (Goldberg, 2003).

In Hefen können drei verschiedene ERAD-Wege definiert werden (Vashist and Ng, 2004; Vembar and Brodsky, 2008): (i) ERAD-L erkennt Proteine mit Läsionen im lumenalen Bereich. Für die Erkennung zuständig sind Yos9 und Kar2p (Willer *et al.*, 2008). Anschließend wird das defekte Protein zum Hrd1p-Komplex (Hrd1p, Hrd3p, Usa1p und Der1p) transferiert und durch die E3-Ligase Hrd1p ubiquitiniert (Willer *et al.*, 2008). Die Ubiquitinierung findet im Zusammenspiel mit einem E2-Ub-Konjugierenden Enzym, Ubc7p, statt, das durch Cue1 in der Membran

verankert ist (Willer *et al.*, 2008). Außerdem sind Sec12 und Sec18 wichtig, die den Transport von transmembranen Modellproteinen zum Golgi-Apparat ermöglichen, aber nicht für den mutierten Vorläufer des löslichen Mating-Pheromon  $\alpha$  (Vashist *et al.*, 2001; Vashist und Ng, 2004). (ii) ERAD-M erkennt Läsionen innerhalb von Transmembrandomänen und nutzt die gleichen Proteinkomplexe wie ERAD-L (Vembar und Brodsky, 2008). Die Detektion der Läsion selbst ist bis heute nicht geklärt. Hrd1p spielt eine entscheidende Rolle und kann mit seiner Transmembrandomäne zwischen ERAD-L und ERAD-M Substraten unterscheiden (Sato *et al.*, 2009). (iii) ERAD-C erkennt Läsionen in cytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen durch cytoplasmatische Hsp70 und Hsp40 Chaperone (Ravid *et al.*, 2006). Fehlerhafte Proteine werden dann durch die E3-Ub-Ligase Doa10p ubiquitiniert (Ravid *et al.*, 2006). Welches Protein für die Läsionsdetektion zuständig ist, ist noch unklar. Cue1p ist essentiell für ERAD-C (Vashist und Ng, 2004).

Am Ende der drei möglichen ERAD-Wege rekrutiert Ubx2p den Cdc48p-Ufd1p-Npl4p-Komplex zur zytoplasmatischen Seite der ER-Membran, der für einige Substrate essentiell für die Retrotranslokation ist (Ye *et al.*, 2003). Für einige andere Substrate ist nur das Proteasom notwendig (Lee *et al.*, 2004). Neben Yos9 existieren weitere wichtige Faktoren für ERAD, nämlich HERP (homoCys-responsive ER-resident protein) bzw. Usa1p in Hefe, Hrd1 selbst und EDEMs (Ng *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2006; Carroll und Hampton, 2010; Johnson und van Waes, 1999). Das Proteasom bindet direkt an den Sec61-Kanal und diese Bindung wird durch die zuvor erwähnte vierfach Mutante *sec61-302* inhibiert (Ng *et al.*, 2007).

Proteine müssen auf korrekte Faltung überprüft werden, da sie sonst mit den funktionsfähigen Proteinen um Substrate, Kofaktoren oder Interaktionspartnern konkurrieren (Plempner und Wolf, 1999; Dobson und Ellis, 1998). Fehlgefaltete Proteine tendieren außerdem dazu Aggregate zu bilden, die toxisch für die Zelle sein können (Plempner und Wolf, 1999; Dobson und Ellis, 1998). Ausfälle in der Degradation fehlgefalteter Proteine führen zu Krankheiten, wie Diabetes,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, schweren Anämien und Alzheimer (Lloyd *et al.*, 2010, Lukacs und Verkman, 2012, Lomas und Parfrey, 2004, Goldberg, 2003).

Der Loop 4 von Sec61 verknüpft die beiden Transmembrandomänen 4 und 5, weshalb strukturelle Veränderungen in diesem Loop durch Bindung eines temporären Interaktionspartners dazu führen könnte, dass der N- und/oder der

C-Terminus eine Bindestelle für das Proteasom bereitstellt (Ng *et al.*, 2007). Das Proteasom und das Ribosom konkurrieren um die gleiche Bindestelle in der ER-Membran (Kalies *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2007). Die Bindung selbst wird vermittelt von der 19S-Base des 19S regulatorischen Partikels und ist ATP-abhängig (Kalies *et al.*, 2005).

#### **V.4 CPY\*, KHN, KWW, Deg1:Sec62p und ERAD**

Das Gen *Prc1* kodiert für die inaktive präpro-Form einer vakuolären Serin-Protease, die auch als Carboxypeptidase Y (CPY) bezeichnet wird (Valls *et al.*, 1987; Wolf und Fink, 1975). N-terminal befindet sich ein 20 AS langes Signalpeptid, gefolgt von einem Vakuolen-Targetingsignal mit der charakteristischen Aminosäuresequenz „QPRL“ und einem 91 AS langem Propeptid (Abbildung 3; Valls *et al.*, 1987; Jung *et al.*, 1999). Darauf folgt die 421 AS lange Carboxypeptidase Y (Jung *et al.*, 1999). Beim Eintritt ins ER-Lumen wird das Signalpeptid vom Präpropeptid abgespalten, das Propeptid N-glykosyliert und Disulfidbrücken ausgebildet (p1CPY; Valls *et al.*, 1987; Jung *et al.*, 1999). Im Golgi-Apparat wird das Propeptid N-acetylglucosaminiert und danach mannosyliert, Dabei erhöht sich das Molekulargewicht von 67 kDa auf 69 kDa (p2CPY; Abbildung 3; Valls *et al.*, 1987; Jung *et al.*, 1999). Beim Eintritt in die Vakuole wird das Vakuolen-Targetingsignal abgespalten und das Molekulargewicht des reifen CPY erniedrigt sich auf 61kDa (mCPY; Abbildung 3; Jung *et al.*, 1999).

Eine Mutation in der Nähe des katalytischen Zentrums (*prc1-1*) befindet sich an Position G255R und führt zur einer mutierten Variante von CPY, dem sog. CPY\* (Finger *et al.*, 1993). Diese Mutation induziert Fehlfaltungen und führt zur Erkennung von CPY\* durch die Komponenten der ERQC und schließlich zu einem Abbau durch ERAD (Finger *et al.*, 1993, Hiller *et al.*, 1996).

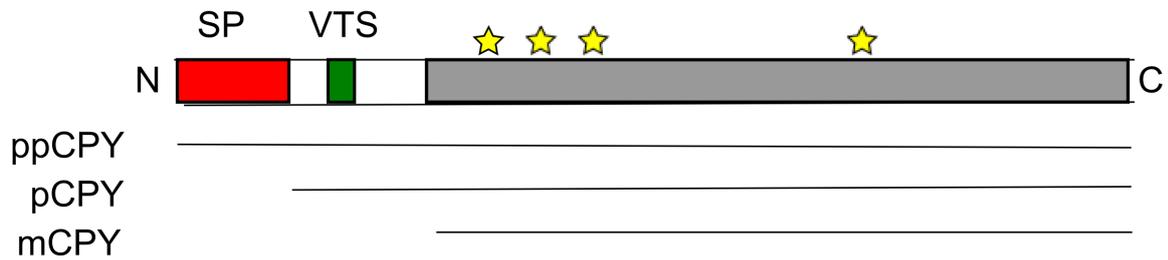
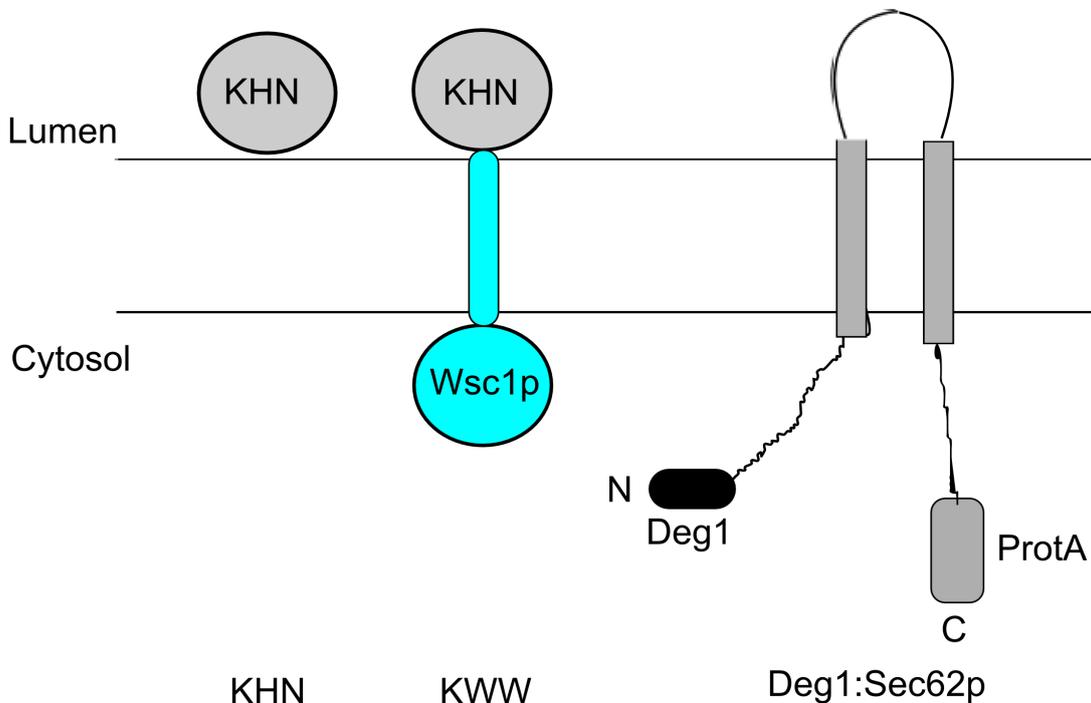
**A****B**

Abbildung 3: Topologische Darstellung, der in dieser Arbeit verwendeten ERAD-Substrate. **A** CPY unterliegt in den unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Wegs verschiedenen Modifikationen, wodurch mehrere Zustände unterscheidbar sind (ppCPY im ER, pCPY im Golgi-Apparat und das reife CPY oder mCPY in der Vakuole). Durch die Glykosylierung von pCPY im ER-Lumen migriert dieses langsamer als ppCPY. **B** KHN (grau; links) und KWW (Mitte) sind eng miteinander verwandt und unterscheiden sich nur durch die transmembrane und cytoplasmatische Domäne von Wsc1p (blau) in KWW. Beide sind bekannte ERAD-L-Substrate. Deg1:Sec62p (rechts) ist ein ERAD-Substrat, dass zweimal die Membran durchdringt und N-terminal mit einer Degradationssequenz fusioniert ist. Sp= Signapeptid, VTS= Vakuolen Targeting Signal, gelbe Sterne= Glykosylierungsstellen, N= N-Terminus, C= C-Terminus

KHN ist ein artifizielles Fusionsprotein bestehend aus der Signalsequenz von Kar2p fusioniert an die Ectodomäne der Neuraminidase des Simian Virus 5 (Vashist und Ng, 2004). Es lokalisiert im ER-Lumen und wird über den ERAD-L Weg degradiert (Vashist und Ng, 2004). KWW ist ein chimäres, transmembranes ERAD-Substrat und

besteht auf lumenaler Seite aus KHN und auf transmembraner und cytosolischer Seite aus Wsc1p (Vashist und Ng, 2004). Wsc1p ist ein nicht essentielles transmembranes Signalprotein, das in der Typ I-Orientierung vorliegt (Abbildung 3, Lodder *et al.*, 1999; Vashist und Ng 2004; Vashist *et al.*, 2001). KHN und KWW werden nach dem ER weiter O-glykosyliert (Vashist *et al.*, 2001).

Durch die Fusion der Degradationssequenz Deg1 an den N-Terminus von Sec62p entsteht ein weiteres ERAD-Substrat, Deg1:Sec62p (Abbildung 3, Deshaies und Schekman, 1989). Deg1:Sec62p liegt in SDS-Gelen in zwei Formen vor, einer unglykosylierten und einer langsamer migrierenden glykosylierten Form (Scott und Schekman, 2008). An den C-Terminus von Deg1:Sec62p wurde ProtA fusioniert (Scott und Schekman, 2008). Der cytosolische N-Terminus von Deg1:Sec62p beinhaltet eine N-Glykosylierungsstelle, die ins ER-Lumen hineinragt und modifiziert wird, während die beiden TMD in der Lipiddopelschicht inseriert sind (Rubenstein *et al.*, 2012). Solche Proteine blockieren den Sec61-Kanal und werden durch ERAD beseitigt (Rubenstein *et al.*, 2012).

## **V.5 Die Unfolded Protein Response (UPR)**

Störungen im kontrollierten Abbau fehlerhafter Protein führen zu einer Aggregation und Akkumulation toxischer Proteine im ER-Lumen (Paschen und Mengesdorf, 2005). Um dieser Toxizität entgegen zu wirken, reagiert die Zelle mit entsprechenden Gegenmaßnahmen, wie der gesteigerten Synthese von ER-Membranen, Chaperonen uvm (Lee, 1992; Bertolotti *et al.*, 2000). Diese Maßnahmen stehen am Ende einer Signalkaskade, der sogenannten Unfolded Protein Response (UPR). In Säugern existieren drei unterschiedliche Wege: (i) der ATF6- Weg, (ii) der PERK-Weg und, der einzige auch in Hefe verbreitete, (iii) IRE1-Weg (Chakrabarti *et al.*, 2011; Gardner *et al.*, 2013).

Ire1p detektiert ER-Stress durch einen noch nicht geklärten Mechanismus, aber mehrere Szenarien sind denkbar: (i) Kar2p dissoziiert von der lumenalen Domäne von Ire1p, sobald der Bedarf an Kar2p durch eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER überhand nimmt (Chakrabarti *et al.*, 2011). (ii) Ire1p erkennt die fehlgefalteten Proteine direkt und beginnt mit der Autophosphorylierung sobald diese einen Grenzwert überschreiten (Chakrabarti *et al.*, 2011). Sobald Kar2p vom Ire1p-Rezeptor dissoziiert ist, dimerisiert und oligomerisiert dieser und autophosphoryliert anschließend *in-trans* (Bertolotti *et al.*, 2000). Die cytosolische

Domäne aktiviert dann ihre Ribonuklease-Aktivität, schneidet die Hac1-prä-mRNA und entfernt ein Intron (Cox und Walter 1996; Sidrauski und Walter 1997). Die beiden mRNA-Exons werden dann durch die tRNA-Ligase Rlg1p/Trl1p ligiert und translatiert (Chakrabarti *et al.*, 2011). In Säugern konnte gezeigt werden, dass das Spleißen des Xbp1-ORF (dem Säuger-Homolog von Hac1p) zur Folge hat, dass eine hydrophobe Region nicht mehr translatiert wird und aus dem transmembranen Xbp1p das lösliche und kerngängige Xbp1p resultiert (Yanagitani *et al.*, 2011). Der entstandene Transkriptionsfaktor aktiviert im Nukleus Gene, die zu einer Reduktion der Proteinlast im ER führen, oxidativem Stress vorbeugen und Oberflächenproteine verstärkt exprimieren (Mori *et al.*, 2000; Ruegsegger *et al.*, 2001; Kimata *et al.*, 2006). Diese Gene sind unter der Kontrolle des sogenannten Unfolded Protein Response Element (UPRE), eines Promoters an den das Xbp1p bindet und die Transkription startet (Mori *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1998).

## **V.6 Proteinmodifikationen: N-Acetylierung und Ubiquitinierung**

Die N-Acetylierung ist eine ubiquitär verbreitete Modifikation, bei der die Acetylgruppe eines Acetyl-CoA auf die  $\alpha$ -Aminogruppe der zu modifizierenden Aminosäure transferiert wird (van Damme *et al.*, 2011). Die N-Acetylierung erfolgt sobald 20-50 AS des Proteins vom Ribosom translatiert wurden (Polevoda und Sherman, 2000).

In *S. cerevisiae* existieren vier unterschiedliche N-Acetyltransferasen, die in ihrer Substratspezifität eindeutig voneinander unterschieden werden können (Mullen *et al.*, 1989; Polevoda *et al.*, 1999; Polevoda *et al.*, 2009; Park und Szostak, 1992). Der NatA-Komplex besteht aus Nat1p, Nat5p und Ard1p und acetyliert Substrate mit der Aminosäureabfolge M[S/G/A/T/C/P/V] an Position 2 der Polypeptidkette (Mullen *et al.*, 1989; Park und Szostak, 1992). Nat1p verankert die beiden anderen Untereinheiten am Ribosom und richtet den translatierten N-Terminus derart aus, dass Ard1p die Aminosäure an Position 2 acetylieren kann nachdem das endständige Met durch die Methionin-Aminopeptidase abgespaltet wurde (Gautschi *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* existieren zwei Aminopeptidasen, Map1p und Map2p, deren gleichzeitige Deletion zum Zelltod führt. Zellen mit nur einer Deletion in Map1p oder Map2p sind aber vital. Das Entfernen des endständigen Methionins ist somit essentiell im Leben einer Zelle (Li und Chang, 1995).

Der NatB-Komplex besteht aus dem katalytischen Nat3p und Mdm20p und katalysiert die Acetylierung des N-Terminus von Proteinen mit der Konsensussequenz M[M/D/N/E] (Polevoda *et al.*, 2009). Der NatC-Komplex besteht aus Mak3p, Mak10p und Mak31p und erkennt Termini, die der M[I/L/T/F] Sequenz genügen (Tabelle 1, Tercero *et al.*, 1992 und 1993; Tercero und Wickner, 1992). Die drei katalytischen Untereinheiten können auch noch in einem zweiten gemeinsamen Komplex identifiziert werden, dem NatD-Komplex, dieser ist verantwortlich für bestimmte NatA-Sonderfälle in Abhängigkeit weiterer Aminosäuren upstream (Polevoda *et al.*, 1999; Hole *et al.*, 2011). In höheren Eukaryonten existieren außerdem der NatE und der NatF-Komplex (van Damme *et al.*, 2011).

Tabelle 1: Die Acetylierung in *S. cerevisiae* ist sequenzspezifisch. Die Aminosäure nach dem initialen Methionin bestimmt welcher N-Acetylierungskomplex die N-Acetylierung übernimmt. Der NatA-Komplex acetyliert kleine Aminosäuren (S, A, G, T, C, V), NatB acetyliert basische Aminosäuren (E, D, N) und NatC große hydrophobe Aminosäuren (I, L, W, F). Im Falle von NatA wird zuerst das Initiator-Met durch MAP1 oder MAP2 entfernt (Polevoda *et al.*, 2009).

<b>AS an Position 2</b>	<b>acetylierender NAT-Komplex</b>	<b>MAP1/2-Aktivität</b>
Ser, Ala, Gly, Thr, Cys, Val	NatA/NatD	ja
Met-Glu, -Asp, -Asn	NatB	nein
Met-Ile, -Leu, -Trp, -Phe	NatC	nein

Im Falle des NatA ist das Entfernen des endständigen Methionins notwendig. Dagegen sind NatB und NatC auf das Abspalten des Methionins nicht angewiesen und acetylieren das endständige Methionin (van Damme *et al.*, 2011).

Mehr als die Hälfte aller Proteine in Hefe und ca. 80% der humanen Proteine werden N-acetyliert, dennoch ist die Funktion dieser Modifikation nicht näher beschrieben (Driessen *et al.*, 1985). Entgegen der weit verbreiteten Meinung, dass die N-Acetylierung ausschließlich der Stabilität von Proteinen dient, wurde in aktuellen Publikationen gezeigt, dass die N-Acetylierung noch weitere physiologische Funktionen besitzt: Die N-Acetylierung beeinflusst die (i) Actin-Tropomyosin Interaktion und die Myosin-Motoraktivität in Muskelgewebe, (ii) den CPY-Inhibitor Tfs1, sodass dieser seine Aktivität entfalten kann und CPY inhibiert (Arnesen, 2011;

van Damme *et al.*, 2011). Der Verlust der N-Acetylierung am N-Terminus der (iii) NADP-spezifischen Glutamat-Dehydrogenase aus *Neurospora crassa* führt zur thermalen Instabilität (Arnesen, 2011). Im Bereich der Proteinsekretion konnte gezeigt werden, dass die (iv) GTPasen Arl3p und Grh1p durch NatC acetyliert werden und nur dann ein Targeting zum Golgi korrekt abläuft (Arnesen 2011; van Damme *et al.*, 2011). Mak3p acetyliert außerdem ein Hüllprotein des (v) L-A-Virus und ermöglicht damit die Assemblierung der Virushülle in *S. cerevisiae* (Arnesen 2011; van Damme *et al.*, 2011; Tercero und Wickner, 1992).

Außerdem steht die N-Acetylierung in direkter Konkurrenz zur Signalpeptiderkennung und könnte damit ein Signal zur cytosolischen Retention darstellen (Forte *et al.*, 2011). Für Proteine mit einem Signalpeptid für den cotranslationalen Transport und einem Signal zur N-Acetylierung wurde keine Retention im Cytosol beobachtet vermutlich weil das SRP mit den NATs konkurriert (Forte *et al.*, 2011).

## V.7 N-Degrans und Proteinstabilität

Diejenigen Bestandteile von Proteinen, die zu einer Instabilität des Proteins führen, werden als Degradationssignale oder Degrans bezeichnet (Varshawsky 1991).

Werden  $\beta$ -Galaktosidasevarianten mit verschiedenen N-terminalen Aminosäuren in *S. cerevisiae* exprimiert, so zeigen sich Veränderungen der Degradationsrate der Fusionsproteine (Bachmair *et al.*, 1986). Der Einfluss der N-Termini auf die Stabilität von Proteinen ist als sog. „N-end rule Pathway“ bekannt und die verantwortlichen Proteinbereiche im N-Terminus werden als N-Degrans bezeichnet (Varshawsky, 1996; Bachmair *et al.*, 1986).

Ein N-Degron zeichnet sich durch 2 Eigenschaften aus: (i) eine destabilisierende Aminosäure am N-Terminus und (ii) ein internes Lysin zum Anfügen einer Polyubiquinkette (Bachmair und Varshawsky, 1989; Dohmen *et al.*, 1994; Varshawsky, 1997). Die N-Degrans werden in drei unterschiedliche hierarchische Klassen eingeteilt: (i) tertiäre Degrans (Asn und Gln) werden durch N-terminale Amidasen (Nt-Amidasen) deaminiert und in (ii) sekundäre Degrans (Glu und Asp) überführt um anschließend durch die Arg-tRNA-Transferase oder R-Transferase argyniliert zu werden (Varshawsky, 1997). Daraus resultierende Proteine besitzen nun ein endständiges Arg und gehören zur Klasse der (iii) primären Degrans (Varshawsky, 1997). Diese werden durch E3-Ligasen (oder auch

N-Recognine) erkannt (Bartel *et al.*, 1990). In Bakterien existieren außerdem noch Phe bzw. Leu-Transferasen, die freie Arg und Lys-Enden modifizieren (Shrader *et al.* 1993).

In *S. cerevisiae* wird N-Recognin durch das UPR1-Gen kodiert und ist ein 225 kDa großes Protein, das destabilisierende N-Termini erkennt (Bartel *et al.*, 1990; Varshavsky, 1996). Dies betrifft, neben Enden mit Arg, auch diejenigen mit Phe, Leu, Trp, Tyr, Ile, Arg, Lys oder His (Bartel *et al.*, 1990, Varshavsky, 1996).

Die destabilisierenden Enden können in zwei biochemische Gruppe unterteilt werden: (i) basische Enden mit Arg, Lys oder His und (ii) große hydrophobe Enden wie Tyr, Phe, Ile, Leu oder Trp (Varshawsky, 1997). Für beide Gruppen existieren in N-Recogninen aus Hefen unterschiedliche Bindestellen, die ohne die andere zu beeinflussen mutiert werden können (Varshawsky, 1997).

Vor kurzem wurde eine neue Form der Degrons identifiziert, die in engem Zusammenhang mit der N-Acetylierung steht (Hwang *et al.*, 2010). Eine bestimmte Subpopulation von N-acetylierten Proteinen wurde von Doa10p erkannt und mit Ubiquitin markiert (Hwang *et al.*, 2010). Hwang *et al.* (2010) vermuten sogar eine weitere Form der Qualitätskontrolle um korrekte Faltung zu gewährleisten. In diesem Szenario würden die N-terminalen Enden der Proteine schnell falten oder mit Chaperonen der Hsp90-Familie interagieren und das Protein stabilisieren, selbst wenn die N-terminale Aminosäure laut N-end rule destabilisierend wirken würde (Hwang *et al.*, 2010).

Bei einer Verlangsamung der Faltung des N-terminalen Bereichs durch Oxidation, Hitze oder eine Mutation wird der N-Terminus nicht mehr acetyliert und das Protein durch Ub-Ligasen, wie Doa10p, erkannt und schneller abgebaut (Hwang *et al.*, 2010).

## **V.8 Die unterschiedlichen Klassen prokaryontischer Signalpeptide und der bakterielle Translokationskomplex**

In *E. coli* werden Proteine mit klassischen Signalpeptiden über einen heterotrimeren, integralen Membranproteinkomplex transportiert (*SecYEG*), unterstützt durch die ATPase SecA und dem Chaperon SecB (Driessen und Nouwen, 2008). SecB unterbindet eine verfrühte Faltung des neu synthetisierten sekretorischen Proteins, dass durch Hilfe von SecA durch den *SecYEG*-Kanal unter Verbrauch von ATP transloziert wird (Economou und Wickner, 1994). Ein typisches Signalpeptid ist 21

bis 23 Aminosäuren lang und besteht aus einer N-, einer H- und einer C-Domäne (von Heijne, 1983 und 1985). Die N-Domäne am Aminoterminus ist nettopositiv geladen und enthält mindestens ein Ala oder Lys (von Heijne, 1983 und 1985). Der N-Domäne folgend befindet sich die H-Domäne, die aus einer Abfolge hydrophober Aminosäuren besteht, dem sogenannten hydrophoben Kern (von Heijne, 1983 und 1985). Die carboxyterminale C-Domäne beinhaltet die Signalpeptid-Spaltstelle und eine Vielzahl polarer Aminosäuren (von Heijne, 1983 und 1985). Entscheidend für die Orientierung innerhalb des Translokationskanals ist die Ladungsverteilung auf beiden Seiten der H-Domäne (von Heijne, 1986). Der hydrophobe Kern selbst wird benötigt für Öffnung des Kanals und interagiert dabei mit hydrophoben Aminosäuren im kontraktilen Ring (Beltzer *et al.*, 1991).

Das Tat-Translokationssystem (Twin-Arginin-Transporter) von *E. coli* ist ein 600 kDa großer Transmembrankomplex, der hauptsächlich mit Redoxproteinen interagiert, die es dann im gefalteten Zustand über die Membran transportieren kann (Berks *et al.*, 2000; Berks, 1996). Ihren Namen erhielten Tat-Signalpeptide durch die beiden Arginine des RRXFLK-Motiv (Lee *et al.*, 2006). Tat-Signalpeptide sind signifikant länger als konventionelle Signalpeptide (Lee *et al.*, 2006). Die meisten der zu transportierenden Proteine assemblieren mit Cofaktoren innerhalb der Zelle bevor sie durch die Tat-abhängige Translokation über die Membran transportiert werden (Berks *et al.*, 2000; Berks 1996).

Für die Signalpeptide von Lipoproteinen charakteristisch ist die sogenannte Lipobox Konsensussequenz [LVI/ASTG/GA/C] (Juncker *et al.*, 2003). Das terminale Cystein wird anschließend mit einem Lipid modifiziert und ist, nach der Abspaltung durch die Signalpeptidase, die erste Aminosäure des reifen Proteins (Hantke und Braun, 1973). Obwohl die meisten Lipoproteinsignalpeptide über den Sec-Weg transportiert werden, gibt es Hinweise, dass einige wenige Lipoproteine über den Tat-Weg transportiert werden (Dilks *et al.*, 2005). Signalpeptide der Lipoproteine sind geringfügig kürzer als konventionelle Signalpeptide, wegen der kürzeren N- bzw. H-Domäne (19-20 Aminosäuren; von Heijne, 1989).

## **V.9 Die Insertion von Transmembranproteinen**

Eine weitere Funktion des SecYEG-Komplex und seiner Homologe ist die Insertion von Transmembranproteinen in die Lipiddoppelschicht (Urbanus *et al.*, 2001; Kocik *et al.*, 2012). Proteine durchspannen die Membran mit ihrer Transmembrandomäne, die

aus einer Abfolge von 20 hydrophoben Aminosäuren besteht (Bretscher und Munro, 1993). Wichtig für die Orientierung innerhalb der Membran sind die Ladungen, die die erste Transmembrandomäne umgeben, so besagt die „positive-inside rule“, dass eine Transmembrandomäne sich in einer Form ausrichtet in der das nettopositive Ende im Cytoplasma lokalisiert ist (von Heijne, 1989).

Die Orientierung der ersten Transmembrandomäne bestimmt dann die Orientierung der nachfolgenden Transmembrandomänen in mehrfach durchspannenden Membranproteinen (Beltzer et al., 1991; Heijne, 1986). Die Länge und die durchschnittliche Hydrophobizität der Transmembranproteine sind wichtige Faktoren für die Insertion in die Membran (Sääf *et al.*, 1998). Die stufenweise Integration des mehrfach durchspannenden Membranproteins in die Lipiddoppelschicht bringt eine enge Wechselwirkung der hydrophoben Transmembrandomänen mit den umgebenden Lipiden mit sich (Wang *et al.*, 2002; Dowhan und Bogdanov, 2009). Die umgebende Lipidzusammensetzung übt einen Einfluss auf die Proteintranslokation aus (Wang *et al.*, 2002; Dowhan und Bogdanov, 2009).

Verantwortlich für die laterale Öffnung in SecYEG ist der gemeinsame Bereich von TM2/3 und TM7/8 (van den Berg *et al.*, 2004).

Der teilweise geöffnete Zustand wird induziert durch die Bindung von zytosolischen Faktoren, wie SecA und ermöglicht die Bindung der Signalsequenz an die Signalsequenzbindestelle innerhalb des Translokationskanals (Zimmer *et al.*, 2008). Im vollständig offenen Zustand ist der Spalt zwischen den beiden Hälften von TM2/3 und TM7/8 groß genug um die Freisetzung einer  $\alpha$ -Helix zu gewährleisten (van den Berg *et al.*, 2004).

## **V.10 Anpassung psychrophiler Organismen an ihre Umgebung**

Während der Evolution mussten sich Prokaryonten an eine Reihe extremer Bedingungen anpassen: Sie tolerieren niedrige und hohe pH-Werte (azidophil und alkaliphil), hohe Salzkonzentrationen (halophil) oder hohe Zuckerkonzentrationen (osmophil) und sehr trockene Habitate (xerophil; Sellek und Chaudhuri, 1999; Mesbah und Wiegel, 2008). Prokaryonten bevölkern sehr hohe und sehr niedrige Temperaturen (thermophil bzw. psychophil; Sellek und Chaudhuri, 1999). Psychophile Organismen, die nicht ausschließlich auf Prokaryonten beschränkt sind,

mussten Wege finden um ein Einfrieren ihrer Membranen oder ihres Blutes zu verhindern (Römisch und Matheson 2003). Dazu wurden Hitzeschock-Antworten bei niedrigen Temperaturen induziert und strukturelle Veränderungen ihrer Enzyme und ihres Cytoskeletts etabliert um die Funktion in der Kälte zu gewährleisten (Römisch und Matheson 2003). Weiterhin müssen psychrophile Organismen in der Lage sein zelluläre Prozesse wie die Proteinbiosynthese und die DNA-Replikation bei Temperaturen aufrechtzuerhalten, die in mesophilen Organismen zu einem Arrest führen (Römisch und Matheson 2003; Clark *et al.*, 2004).

Zellbiologie in der Kälte wird immer wichtiger im Bereich der polaren Forschung. Die Proteinsekretion ist in allen Organismen einer der essentiellsten Prozesse und ist besonders interessant in Anbetracht der Tatsache, dass Proteintranslokation über ihre Membranen auch dann noch bei Temperaturen möglich ist, die zu einem Stopp des Transports in herkömmlichen Hefen oder Säugerzellen führen (Römisch *et al.*, 2003). Diese beständige Funktion spricht für Adaptionen der Proteintranslokationsmaschinerie und Translokationssignalen in der Kälte (Römisch und Matheson, 2003). In vorangegangenen Arbeiten wurden die Sec61p Homologe aus verschiedenen psychrophilen Eukaryoten analysiert und geringe Aminosäure Unterschiede festgestellt, die möglicherweise das Resultat einer Anpassung an die extreme Kälte sind (Römisch *et al.*, 2003).

Die relative Stärke der hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen ändert sich in der Kälte (Baldwin, 1986). Letztere werden stärker wohingegen die zuerst genannten schwächer werden (Baldwin, 1986). Für lösliche Proteine ist bekannt, dass kälte-adaptierte Enzyme oftmals weniger Salzbrücken ausbilden und hydrophobe Aminosäuren auf ihrer Oberfläche exponieren, die in Mesophilen innerhalb des Enzyms vorliegen würden (Fields und Somero, 1998; Russel, 2000; Gianese *et al.*, 2001; Leiros *et al.*, 2000; Petrescu *et al.*, 2000).

Da Signalpeptide strukturell und funktionell konserviert sind zwischen Eukaryonten und Prokaryonten, wurden in dieser Arbeit die Genome mehrerer Gram-negativer Bakterien bioinformatisch untersucht, um Anpassungen der Signalpeptide und Transmembrandomänen an die extreme Kälte zu identifizieren.

## **V.11 Bekannte Mutationen in Sec61-Homologen**

Eine Reihe von Punktmutationen in Sec61p und Homologen ist bekannt für ihre Auswirkungen auf die Translokation. Da einige Mutationen auf ihre Exportkompetenz

überprüft werden, sollen an dieser Stelle diejenigen Mutationen vorgestellt werden, die für diese Arbeit wichtig sind.

In *E. coli* wurde eine Vielzahl von Mutationen in SecY (PrIA) charakterisiert, die Effekte auf die Translokation haben. Eine dieser Mutationen (prl4a-1: F286H in *E. coli* bzw. *sec61F311Y* in *S. cerevisiae*) wurden in dieser Arbeit auf ihre Exportkompetenz untersucht. Prl4a-1 führt zu einem Stopp der Staphylokokkuskinase Prozessierung und liegt in *S. cerevisiae* in Loop 7 (Sako, 1991). Die Mutation P40S liegt im N-Terminus von SecY aus *E. coli* und zeigt moderate Defekte im Proteinexport von OmpA (Ito *et al.*, 1989). In *S. cerevisiae* wurde die Homologe Mutation P50S etabliert und auf ERAD-Defekte untersucht.

Die Mutation M450K liegt in TMD10 und ist Bestandteil des kontraktilen Rings (Junne *et al.* 2007). Sie zeigt keinen Einfluss auf den posttranslationalen oder den cotranslationalen Import, nimmt aber Einfluss auf die Topologie eines CPY-LacZ-Fusionsproteins mit einem H1-Signalanker (Junne *et al.*, 2007). In SecY existiert eine verwandte Mutation I408N (prlA4 und prlA6) die den Status des kontraktilen Rings destabilisiert (de Keyzer *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005; Emr *et al.*, 1981). In dieser Arbeit wurde, in Anlehnung an beide Mutanten, die Mutation M450N etabliert und auf ERAD-Defekte untersucht.

Mäuse wurden mit Ethylnitrosurea mutagenisiert und auf Hyperglykämie gescreent. In diesem Screen wurde eine Mutation entdeckt (Y344H), deren Symptome durch *Sec61 $\alpha$ 1* (dem Mäuse-Homolog zu *SEC61*) unterdrückt werden konnten (Lloyd *et al.*, 2010). Diese Mutation führt in  $\beta$ -Zellen der Maus zur Apoptose und zur verminderten Insulinsekretion (Lloyd *et al.*, 2010). Dieser Phänotyp entspricht weitestgehend dem vom Immunsystem induzierten Typ-II-Diabetes (Lloyd *et al.*, 2010). In der Maus konnte kein Effekt der Mutation auf Faltung, Transport oder Qualitätskontrolle abgeleitet werden (Lloyd *et al.*, 2010). In HeLa-Zellen führt die Mutation Y344H in Sec61 $\alpha$  außerdem zu einem ungewollten Ca<sup>2+</sup>-Efflux (Schäuble *et al.*, 2012).

# VI. Material und Methoden

## VI.1 Geräte

BioradPowerPac HC; -1000	Biorad
Autoklav	Systemec
BeadBeater	Biospec Products
Blotting-System	Trans-Blot Cells Bio-Rad laboratories
DNA-Gelelektrophorese-System	Lifetechnologies Horizon 58
Elektronische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Entwicklermaschine	AGFA
Geltrockner	BioRad
Homogenisator	Potter Eurostar Power B
Hyperkassette	Amersham pharmacia biotech; GE Healthcare
Inkubator 30°C	Innova New Brunswick Scientific Edison NY, USA
Inkubator 37°C	Haereus
Magnetrührer	Neolab
Mikroskop	Leitz Wetzlar
PCR-Cycler	Peqstar 2 x gradientPeqlab; Robocycler Gradient 96 Stratagene
pH-Meter	Denver Instruments
Phosporplatten	GE Healthcare
Photometer	Amersham Biosciences
Pipettensatz 2, 20, 200, 1000	Gilson
Rotationsrad	Neolab
Schüttler	Rotatest Shaker Luckham
SDS-Gelelektrophorese	XCellSureLock® Mini-Cell Invitrogen life technologies
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer compact
Trockenschrank	Heraeus
Typhoon: Phosphorimager	GE Healthcare
Vakuumverdampfer	Eppendorf concentrator plus
Vortexer	Marienfeld; Scientific industriesVortex Genie
Waage	Sartorius
Wasseraufbereiter	Milipore
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen	
MiniSpin	Eppendorf
Tischzentrifuge kühlbar	Eppendorf centrifuge 5415R
Tischzentrifuge	Sigma 2-168
PCR-Tischzentrifuge	Neolab

Sorvall  
Ultrazentrifuge Optima L-90K  
Kühlzentrifuge

Sorvall Evolution RC  
BeckmanCoulter  
Sigma 4K15

## VI.2 Verbrauchsmaterialien

Minipräparation (Invisorb Spin Plasmid Mini Two)	Invitek
Maxipräparation (GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit)	Sigma lifescience
Kryotubes	Corning
Objektträger Super premium microscope slides	BDH
Nitrozellulose	BioRad
Pipettenspitzen (Premium Tips)	Biozym
Röntgenfilme Medical X-Ray Films	Fuji
Chromatographie-Papier (Whatman™)	GE Healthcare UK Limited
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner
Quarzküvette 105.202.008-QS	Hellma
Sterilfiltrationsapparaturen 250 bzw. 500 ml	NALGENE Labware
Serologische Einwegpipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt
Einweg Küvetten 1ml	
Sterilfilter Filtropur Plus 0,2	
Petrischalen	
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, PCR-Tubes	
Kanülen 0,6 x 25 mm; 0,9 x 40 mm	Sterican, Braun
Handschuhe: Latex; Nitril	VWR
Spritzen 30 ml, 50 ml	

## VI.3 Chemikalienliste

DEPC, SDS, Ampicillin, Tunicamycin, Lachssperma-DNA	AppliChem
Casaminosäuren, Hefeextrakt, Pepton, Yeast Nitrogen Base with/without ammonium	BD
Proteinmarker All Blue	BioRad
AEBSF, Cycloheximid, Digitonin (High Purity)	Calbiochem
DNA-Marker 1kb GeneRuler, Proteinmarker PageRuler	Fermentas
ATP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Fluka
Trypton	Fluka
Protein A-Sepharose	GEHealthcare
Agarose, electrophoresis grade	Invitrogen
Mops 20x Electrophorese Puffer	Invitrogen
Methionin-Cystein-Promix ( <sup>35</sup> S)	Perkin Elmer
Trypsin (Sequencing grade)	Promega
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Ethidiumbromid, Hefeextrakt, Pepton aus Casein, Triton-X100	Roth
Aminosäuren: Adenin, L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Histidin, Myo-Inositol, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, para-Aminobenzoessäure, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Tryptophan, L-Threonin, L-Tyrosin, Urazil, L-Valin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau, D(+) Glukose, DMSO, EDTA, DTT, Glassperlen (acid washed), LiAc, NaCl, PEG4000, Natriumazid, Trizma, Tween 20, Anti-Ha Agarose	
Magermilchpulver	Sucofin
ECL, Super Signal West Pico	Thermo Scientific
ConA-Sepharose	VWR

Aceton, Ethanol vergällt, Ethanol absolut, KCl, NaAc, KAc, ZChL  
 Glycin, Essigsäure, Glycerol, Salzsäure, Isopropanol,  
 Methanol

## VI.4 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Quelle / Referenz
KRY898 (BY4742)	<i>MATahis3-1 leu2-0 lys2-0 ura3-0 can1-100</i>	Wildtyp für Untersuchung der N- Acetylierung	AG Schmitt
KRY893 (BY7299)	<i>MATahis3-1 leu2-0 lys2-0 ura3-0 can1-100 YIL030c::kanMX4</i>	Untersuchung der N- Acetylierung	AG Schmitt
KRY892 (BY10976)	<i>ARD1Δ::KanMX6 in BY4742</i>	Untersuchung der N- Acetylierung	AG Schmitt
RSY1132 KRY221	<i>MATα, trp1-Δ1, leu2,3-112, ura3-52, sec61-3</i>	Untersuchung posttranslatinaler Importdefekte	Stirling <i>et al.</i> , 1992
RSY1294 KRY157	<i>MATα can 1-100 leu2-3,- 112 his3-11,-15 trp1-1 ura3- 1 ade2-1 sec61::HIS3 [psec61-32]</i>	Untersuchung posttranslatinaler Importdefekte	Pilon <i>et al.</i> , 1997
KRY461	<i>sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [pGAL-SEC61-URA3]</i>		AG Römisch
KRY889	<i>sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61Y345H-LEU2]</i>	<i>sec61Y345H</i>	Diese Arbeit
KRY890	<i>sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61F311Y-LEU2]</i>	<i>sec61F311Y</i>	Diese Arbeit
KRY891	<i>sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61P50S-LEU2]</i>	<i>sec61P50S</i>	Diese Arbeit

KRY892	sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61M450N-LEU2]	sec61M450N	Diese Arbeit
KRY893	BY4742; Mat a; his3D1; leu2D0; lys2D0; ura3D0; YGL167c::kanMX4	Pmr1p- Deletionsstamm	AG Schmitt
KRY896	sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61ΔL7-LEU2]	sec61ΔL7	Diese Arbeit
KRY897	sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [SEC61-LEU2]	SEC61	Diese Arbeit
KRB899	supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1) [sec61N-LEU2]	Screen im N- Terminus	Diese Arbeit
KRB900	supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1) [sec61L7-LEU2]	Screen in Loop 7	Diese Arbeit
KRB901	supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1) [sec61L8-LEU2]	Screen in Loop 8	Diese Arbeit
KRB902	supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1) [sec61C-LEU2]	Screen im C- Terminus	Diese Arbeit
KRY903	sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61EP-LEU2]	sec61EP	Diese Arbeit

KRY904	<i>sec61::HIS3 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [sec61S2Y-LEU2]</i>	<i>sec61S2Y</i>	Diese Arbeit
KRY462	<i>SEC61 leu2-3 trp1-1 prc1-1 his3-11 ura3-1 [pGAL-SEC61-URA3]</i>	Wie KRY461 aber mit genomischen <i>SEC61</i>	AG Römisch
KRY712 <i>sec61-302</i>	Mata BMA38a, kanr-pGAL- <i>Sec61, his3-Δ200 leu2-3,-112 ura3-1 trp1-Δ1 ade2-1 can1-100</i> [plasmid 14 (LEU-CEN)] [pRS313 (HIS-CEN)]	Kontrollstamm für den Reporterassay	Römisch <i>et al.</i> , 2007
KRY713	Mata BMA38a, kanr-pGAL- <i>Sec61, his3-Δ200 leu2-3,-112 ura3-1 trp1-Δ 1 ade2-1 can1-100</i> [plasmid 14 (LEU-CEN)] [pRS313 (HIS-CEN)-CPY-URA3]	Stamm mit Reporterplasmid für posttranslationalen ER-Import	Römisch <i>et al.</i> , 2007
KRY714	Mata BMA38a, kanr-pGAL- <i>Sec61, his3-Δ200 leu2-3,-112 ura3-1 trp1-Δ 1 ade2-1 can1-100</i> [plasmid 14 (LEU-CEN)] [pRS313 (HIS-CEN)-PHO8-URA3]	Stamm mit Reporterplasmid für cotranslationalen ER-Import	Römisch <i>et al.</i> , 2007

Der Stamm KRY461 spielt eine wichtige Rolle in dieser Arbeit. In diesem Stamm ist *SEC61* genomisch deletiert und das Überleben der Hefen durch ein Galaktose-induzierbares *SEC61*-Plasmid garantiert (Abbildung 4). Mutierte Plasmide können in die Hefezelle transformiert und das Retterplasmid durch 5'-FOA-Selektion wieder entfernt werden. Die einzige exprimierte Sec61p-Spezies ist damit das *sec61*-Gen des neu transformierten und mutierten Plasmids. Um ERAD-Defekte zu bestimmen, wurde außerdem *prc1-1* genomisch integriert, dieses Allel kodiert für CPY\*.

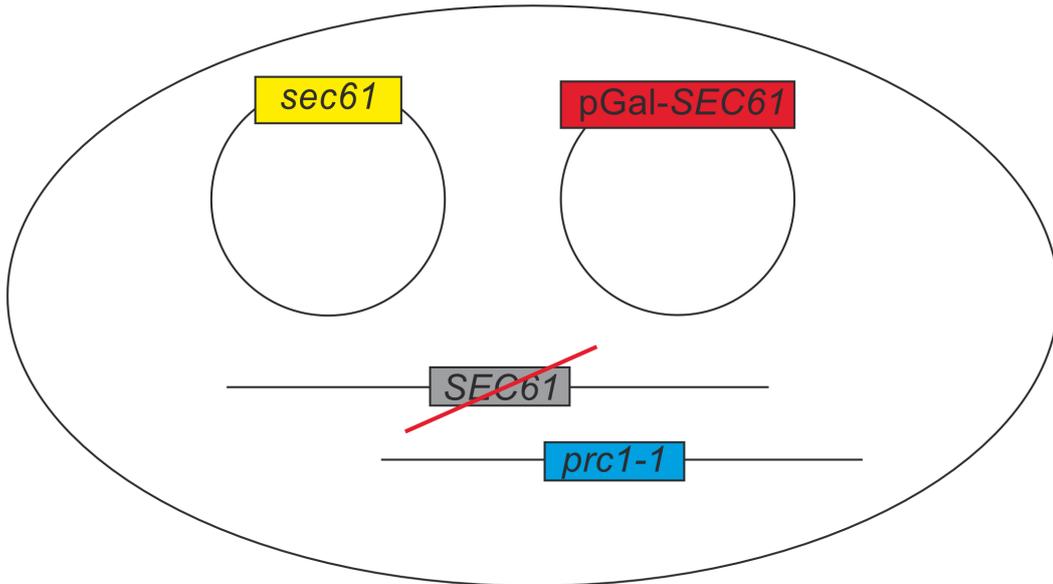


Abbildung 4: Der Hefestamm KRY461 exprimiert keine genomische Kopie von *SEC61* (grau), aber das ERAD-Substrat CPY\* (*prc1-1*; blau). Das Wachstum wird gesichert durch ein Retterplasmid mit *SEC61* unter der Kontrolle eines Gal-Promotors (rot). Die Expression von *SEC61* kann durch Galaktose induziert und durch Glc reprimiert werden. Es ist somit sichergestellt, dass bei Wachstum auf Glc nur das *sec61* des transformierten Plasmids (gelb) exprimiert wird.

## VI.5 Plasmide

Tabelle 2: tabellarische Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Herkunft

Bezeichnung	Herkunft
<i>SEC61</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61N</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61L7</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61L8</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61C</i> -pRS315	Diese Arbeit
pJC30 (KRB733)	AG Ng
pJC31 (KRB734)	AG Ng
PHO8 (KRB856)	AG Brown
CPY (KRB855)	AG Brown
KHN (KRB882)	AG Ng
KWW (KRB883)	AG Ng
Deg1:Sec62 (KRB881)	AG Schekman
<i>sec61P50S</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61F311Y</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61F345H</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61M450N</i> -pRS315	Diese Arbeit
<i>sec61ΔL7</i> -pRS315	Diese Arbeit

## VI.6 Primer

Alle verwendeten Sequenzierprimer wurden durch GATC Biotech oder LGC Genomics synthetisiert. Primer für andere Verwendungen wurden durch Sigma-Aldrich hergestellt. Tabelle 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Primer und ihre Zielsequenz.

Tabelle 3: Übersicht der Primer die in dieser Arbeit verwendet wurden mit Angaben der Primersequenz (5'-3') und des Verwendungszwecks

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Verwendung</b>
M13 FP	TGTAACGACGGCCAGT	Sequenzierung
M13 RP	CAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierung
Mut_SEC61to sec61-32 fwd	CCTCGGATTGCCATCTATTTGTT GTAAATCTTTC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61-32</i>
Mut_SEC61to sec61-32 rev	GAAAGATTAACAACAAATAGATGG GCAATCCGAGG	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61-32</i>
EP_N fwd	CGCAGCGGTCCGCGCTTTACTT	EP des N-Terminus von Sec61
EP_N rev	CGCAGGGAACCTTCCTTTCCGGA	EP des N-Terminus von Sec61p
EP_L7 fwd	CGCAGGACGTCTAACATTTTC	EP des Loop 7 von Sec61p
EP-L7 rev	CGCAGGTATACGATGGTCT	EP des Loop 7 von Sec61p
EP_L8 fwd	CGCAGGTGCAGTATTTTCCAAGAC ATGGATC	EP des Loop 8 von Sec61
EP_L8 rev	CGCAGAGAAAGAGCACCGATGGTA GCAC	EP des Loop 8 von Sec61p
EP_C fwd	CGCAGGCTAGCATTTTGATG	EP des C-Terminus von Sec61p
EP_C rev	CGCAGATATTATTTTCATTTGCA TTC	EP des C-Terminus von Sec61
Mut_Sec61P50S fwd	GATTCTGGGCCAGATTTTCGCTGTA CGGGATCG	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61P50S</i>
Mut_Sec61P50S rev	CGATCCCGTACAGCGAAATCTGGC CCAGAATC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61P50S</i>

Mut_Sec61F311 Y fwd	GATCTCTCAAATCCTTTACCAGAA ATACCCAACC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61F311Y</i>
Mut_Sec61F311 Y rev	GGTTGGGTATTTCTGGTAAAGGAT TTGAGAGATC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61F311Y</i>
Mut_Sec61Y345 H fwd	CTTGAGCGGGTTGGCCTACCACAT CCAACCATTAATGTC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61Y345H</i>
Mut_Sec61Y345 H rev	GACATTAATGGTTGGATGTGGTAG GCCAACCCGCTCAAG	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61Y345H</i>
Mut_Sec61M450 N fwd	CTGGGGCATCCATTTTGAATGCTA CTACCACCATCTAC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61M450N</i>
Mut_Sec61M450 N rev	GTAGATGGTGGTAGTAGCATTCAA AATGGATGCCCCAG	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61M450N</i>
Mut_SEC61to sec61S2Y fwd	CGCTTTACTTTGAAATGTACTCCA ACCGTGTTCTAGAC	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61S2Y</i>
Mut_SEC61to sec61S2Y rev	GTCTAGAACACGGTTGGAGTACAT TTTCAAAGTAAAGCG	Mutagenese von SEC61 zu <i>sec61S2Y</i>
MutSec61 T424C fwd	CAAGTAGAAAACTGACACCGGTT CACGCTTTACTTTG	Einfügen der RsrII Schnittstelle
MutSec61 T424C rev	CAAAGTAAAGCGTGAACCGGTGTC AGTTTTTCTACTTG	Einfügen der RsrII Schnittstelle
MutSec61 A430G fwd	GAAAACTGACACTGGTTCACGCT TTACTTTGAAAATGTC	Einfügen der RsrII Schnittstelle
MutSec61 A430G rev	GACATTTTCAAAGTAAAGCGCGAA CCAGTGTCAGTTTTTC	Einfügen der RsrII Schnittstelle
mutSec61v2 T1738C fwd	CGGTGCTACCATCGGTGCCCTTTC TGTTGGCTCCGACCTACTAG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v2 T1738C rev	CTAGTAGGTCGGAGCCAACAGAAA GGGCACCGATGGTAGCACCG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v3 T1738C fwd	CGGTGCTACCATCGGTGCCCTCTC TGTTGGCTCCGACCTACTAG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v3 T1738C rev	CTAGTAGGTCGGAGCCAACAGAGA GGGCACCGATGGTAGCACCG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v4	CGGTGCTACCATCGGTGCCCTCAC	Einfügen der BbvCI

T1738C fwd	TGTTGGCTCCGACCTACTAG	Schnittstelle
mutSec61v4 T1738C rev	CTAGTAGGTCGGAGCCAACAGTGA GGGCACCGATGGTAGCACCG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v5 T1738C fwd	CGGTGCTACCATCGGTGCCCTCAG TGTTGGCTCCGACCTACTAG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v5 T1738C rev	CTAGTAGGTCGGAGCCAACACTGA GGGCACCGATGGTAGCACCG	Einfügen der BbvCI Schnittstelle
mutSec61v2 A1783T fwd	GGTACTTTAGGTTCTGGGGCTTCC ATTTTGATGGCTACTACC	Einfügen der NheI Schnittstelle
mutSec61v2 A1783T rev	GGTAGTAGCCATCAAAATGGAAGC CCCAGAACCTAAAGTACC	Einfügen der NheI Schnittstelle
mutSec61v3 A1783T fwd	GGTACTTTAGGTTCTGGGGCTACC ATTTTGATGGCTACTACC	Einfügen der NheI Schnittstelle
mutSec61v3 A1783T rev	GGTAGTAGCCATCAAAATGGTAGC CCCAGAACCTAAAGTACC	Einfügen der NheI Schnittstelle
mutSec61v2 A1891G fwd	CTGATTTGATGTGAATACAAAATG AAAATAATATC	Einfügen der Bsml Schnittstelle
mutSec61v2 A1891G rev	GATATTATTTTCATTTTGTATTCA CATCAAATCAG	Einfügen der Bsml Schnittstelle

## VI.7 Antikörper

primäre Antikörper:

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Dissertation verwendeten primären Antikörper mit Angaben zum Wirtstier, zur Verdünnung im Western-Blot bzw. IP und der Herkunft.

Name	Wirt	WB	IP	Quelle
Anti-Pp $\alpha$ F	Kaninchen	1:2000	---	AG Römisch
Anti-CPY	Kaninchen	1:2000	1:200	AG Römisch
Anti-Sec61C	Kaninchen	1:1000	---	AG Römisch
Anti-Sec61N	Kaninchen	1:2500	---	AG Römisch
Anti-Sec62	Kaninchen	1:5000	---	AG Schekman
Anti-Sss1	Kaninchen	1:2000	---	AG Schekman
Anti-Sbh1	Kaninchen	1:2000		AG Römisch
Anti-DPAPB	Kaninchen	---	1:200	AG Brown
Anti-Kar2p	Kaninchen	1:3000		AG Römisch
Anti-PDI	Kaninchen	1:2000	---	AG Römisch

sekundäre Antikörper:

Da alle primären Antikörper dieser Arbeit aus Kaninchen stammen, wurde auch nur ein sekundärer Antikörper (Anti-rabbit; 1:20000; Rockland) benutzt.

## VI.8 Screening nach neuen Mutanten und der Colony-Blot zur Detektion möglicher ERAD-Defekte

Abbildung 5 gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte während der Screens eine detailliertere Beschreibung findet sich in nachfolgendem Text: Die *sec61L7*- und *sec61L8*-pRS315 Plasmide (4  $\mu$ g) wurden für 4 h mit beiden Enzymen und der Fast-AP-Dephosphatase verdaut. Die Varianten *sec61N*- und *sec61C*-pRS315 wurden zuerst für 2 h mit dem ersten Restriktionsenzym bei höherer Temperatur verdaut und anschließend für 2 h bei 37°C mit dem zweiten Restriktionsenzym und der FastAP-Dephosphatase inkubiert:

3µl Puffer  
4µg pDNA  
0,3µl BSA (falls notwendig)  
1µl Enzym I  
1µl Enzym II  
1µl FastAP-Dephosphatase  
ad 30µl H<sub>2</sub>O

Anschließend wurden die geschnittenen Plasmide in einem 0,7%-TAE-Agarosegel (0,7% Agarose, 1x TAE) aufgetrennt und das linearisierte Plasmid extrahiert (VI.10.7).

Durch die EP-PCR wurden die ausgewählten Bereiche amplifiziert (VI.10.12), der PCR-Ansatz durch eine Phenolextraktion von Proteinen und Salz befreit und die DNA anschließend durch eine Isopropanolfällung gefällt (VI.10.8). Das Pellet wurde dann in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert und die DNA nach folgendem Protokoll für 3 h verdaut:

3µl Puffer  
0,3µl BSA  
1µl Enzym I  
1µl Enzym II  
1µl FastAP-Dephosphatase  
ad 30µl EP-PCR

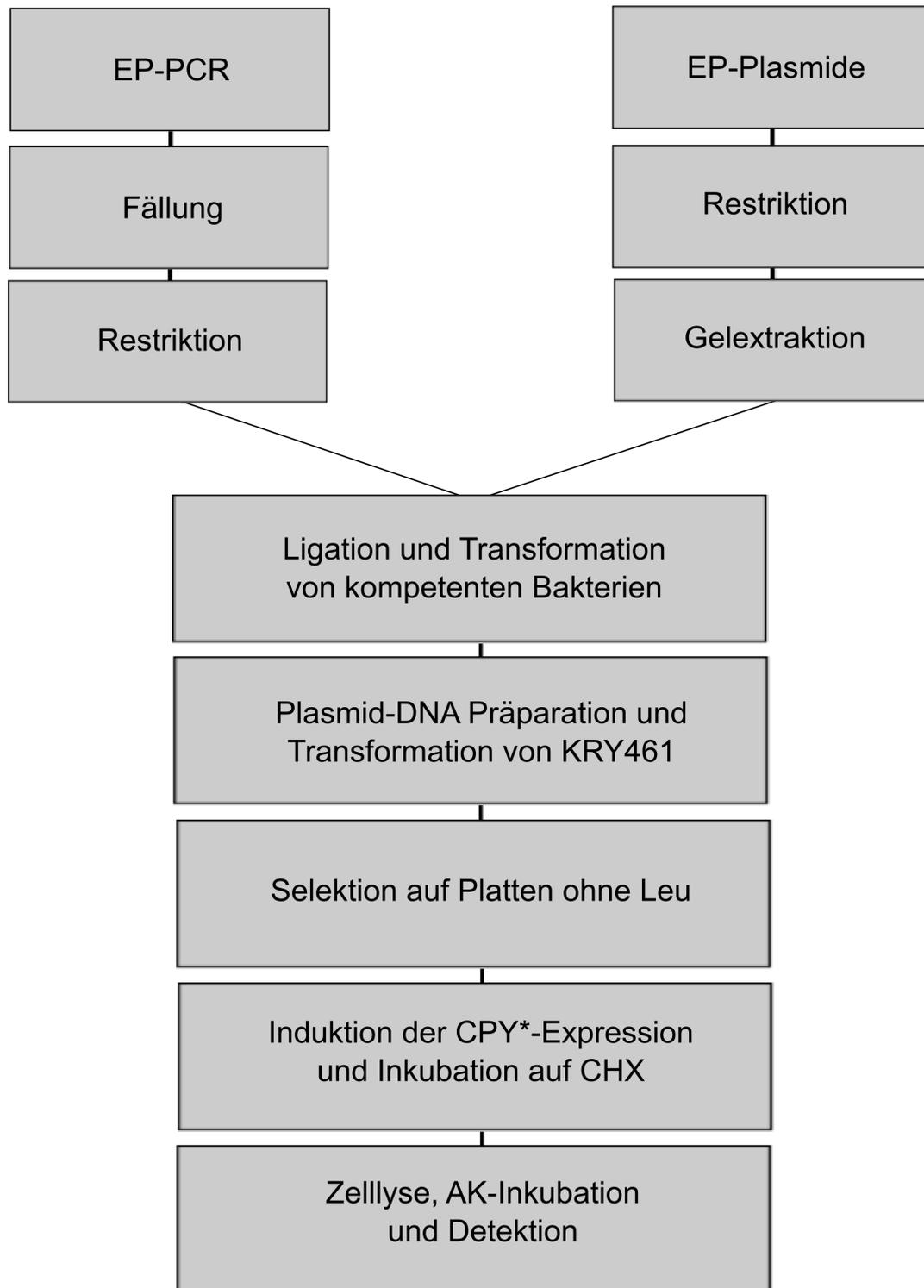


Abbildung 5: Flussdiagramm zum Screening nach neuen Sec61p-Mutanten in zuvor definierten Bereichen. Das Diagramm zeigt die wichtigsten Schritte beim Screening nach neuen Mutanten. Details sind dem Text zu entnehmen.

Danach wurde das geschnittene EP-PCR-Fragment in den geschnittenen und dephosphorylierten *sec61*-pRS315 ligiert:

2µl pDNA  
1µl Ligase (5U/µl)  
2µl Ligase-Puffer  
14µl EP-Fragment

Der Ligationsansatz wurde bei 80°C inaktiviert, in kompetente *E.coli* transformiert (VI.10.2) und in LB-Selektionsmedium aufgenommen.

Nach der Plasmidpräparation wurde die DNA transformiert und die Hefen auf Selektionsmedium (+ Gal, -Leu; 0,67% YNB, 2% Gal, 0,2% AS-Mix, 2% Agar-Agar) ausplattiert und selektiert. Die Kolonien wurden auf eine Nitrocellulosemembran gestempelt und mit der Zellseite nach oben 2 d auf +Glc/-Leu-Platten aufgebracht. Die Glucose reprimiert die Expression des *SEC61* und ermöglicht die alleinige Expression des zufallsmutagenisierten *sec61*. Die Membran wurde anschließend für 2 d mit der Zellseite nach oben auf eine 1% KAc-Platte (10 g/l KAc, 1 g/l Hefextrakt, 0,5 g/l Glc) aufgelegt und danach für 10 h auf einer CHX-Platten (4 µg/ml Cycloheximid, 10 g/l KAc, 1 g/l Hefextrakt, 0,5 g/l Glc) inkubiert. Danach wurden die Zellen in Lysepuffer (0,1% SDS, 0,2 M NaOH, 0,5% β-Mercaptoethanol) lysiert, Zellreste mit TBS-T vorsichtig abgespült und die Membran in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T geblockt. Antikörperinkubation und Waschen wurden so durchgeführt, wie in VI.11.1 beschrieben.

## **VI.9 Bioinformatische Methoden**

### **VI.9.1 Datensets zur Untersuchung psychrophiler Eubacteria bezüglich ihrer Signalpeptide und ihrer Transmembrandomänen**

Die Genome Psychrophiler, Mesophiler und eines Hyperthermophilen wurden auf mögliche Signalsequenzen und Transmembrandomänen untersucht. In die Untersuchung aufgenommen wurden *Psychromonas ingrahamii* 37, *Polaribacter irgensii* 23-P, *Colwellia psychrerythraea* 34H, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (psychrophile Gruppe), *Escherichia coli* str. K-12 substr. W3110, *Polaribacter spec.* MED152, *Pseudoalteromonas tunicata*, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c, *Vibrio cholerae* O395, *Flavobacterium johnsoniae* UW101 (mesophile Gruppe) und *Thermotoga maritima* (hyperthermophil; Gosink *et al.*, 1998; Methe *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*; 1995; Thomas *et al.*, 2008; Holmström, 1998; Nelson *et al.*,

2009). Die sequenzierten Genome sind auf NCBI erhältlich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *P. ingrahamii* ist ein psychrophiles Bakterium isoliert aus Meereis in Nordalaska, das Temperaturen über 10°C nicht toleriert (Riley *et al.*, 2008). Auf Proteinebene ist *V. cholerae* ein enger Verwandter von *P. ingrahamii* (Riley *et al.*, 2008). *P. irgensii* ist ein psychrophiler Vertreter der CFB-Gruppe der Bakterien, Es ist ein antarktisches Isolat aus Oberflächenwasser und wächst zwischen 1,5°C und 12°C. Sein mesophiles Gegenstück ist *F. johnsoniae*. *P. ingrahamii* und *P. irgensii* stellen die psychrophilsten Bakterien, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich analysierten wir die Genome zweier Kälte-adaptierter Bakterien mit höheren Wachstumstemperaturen, *C. psychrerythraea* and *P. haloplanktis*. Letzterer toleriert Temperaturen bis zu 20°. Außerdem wurden zwei weitere Pseudoalteromonas-Arten untersucht, nämlich *P. atlantica* und *P. tunicata*. *P. tunicata* wächst bei Temperaturen von 22 °C und *P. atlantica* tritt in verschiedenen Ozeanen auf der ganzen Welt auf.

Als Repräsentant der anderen Seite der Temperaturskala, wurde *T. maritima*, ein hyperthermophiler Prokaryot mit einer optimalen Temperatur von 80°C in die Analyse einbezogen (Nelson *et al.*, 1999).

## **VI.9.2 Erstellen von Perl-Skripten**

Die Informationen der bioinformatischen Arbeiten wurden automatisiert und mit kleineren Programmen gesammelt. Der Code wurde in der Programmiersprache PERL geschrieben und auf einem Rechner mit MacOSX 10.6 und Terminal kompiliert.

## **VI.9.3 Vorhersagen mit SignalP 3.0 und HMMTOP 2.0**

Proteine des zuvor erwähnten Datensets wurden mit SignalP version 3.0 für gram-negative Bakterien (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), auf ihre Signalpeptide, mit Tatfind (<http://signalfind.org/tatfind.html>) bzw. TatP version 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>), auf ihre TAT-Signalpeptide und mit LipoP version 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) auf ihre Lipoproteinsignalpeptide, untersucht (Nielsen *et al.*, 1997, Bendtsen *et al.*, 2004, Rose *et al.*, 2002, Bendtsen *et al.*, 2005, Juncker *et al.*, 2003).

Proteine wurden als sekretorische Proteine betrachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit >0,950 im HMM (Hidden Markov Model) und ausschließlich

positive Scores im NN (Neuronale Netzwerk) gegeben waren. Tat-Proteine wurden mit der „Perl Syntax Regular Expression“ nach dem Tat-Motiv RR.[FGAVML][LITMVF] untersucht, wobei „.“ Für eine beliebige Aminosäure steht, und zusätzlich bei einem max. S-value >0,500 als identifiziert angenommen. Tat-Proteine wurden zusätzlich durch Tatfind untersucht und als identifiziert betrachtet, wenn das Tat Signal Peptid mit „TRUE“ bestimmt wurde. Lipoprotein Signal Peptide galten als identifiziert, wenn der LipoP-Algorithmus eine Signal Peptidase II Schnittstelle finden konnte.

Transmembrandomänen (TMDs) wurden durch HMMTOP Version 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) vorhergesagt und 15 AS vor der ersten TMD und nach der ersten TMD auf ihre Ladungsverteilung und Ladungsunterschiede untersucht (Tusnady und Simon, 2001 und 1998). Die Gesamttopologie eines Proteins wird ausschließlich durch die erste TMD bestimmt. Außerdem wurden die durchschnittliche Länge und die AS-Zusammensetzung der ersten TMD betrachtet.

#### **VI.9.4 Grafische Darstellung mit SequenceLogo**

Die identifizierten Sequenzen wurden durch ein Perl Script nach ihrer Schnittstelle ausgerichtet und mit ClustalW aligned. Das Alignment wurde anschließend durch WebLogo 2.8.2 (<http://weblogo.berkeley.edu/>) (Schneider und Stephens 1990, Crooks *et al.*, 2004). Grafisch dargestellt. WebLogo zeigt grafisch die Konservierung einzelner Aminosäure Sequenzen und gibt das Maß der Konservierung in bits an (Schneider und Stephens 1990, Crooks *et al.*, 2004).

#### **VI.9.5 GRAVY-Analyse**

Der GRAVY-Score wurde durch ein weiteres Perl-Script bestimmt. Dazu wurde jeder Aminosäure ein Hydrophobizitätskoeffizient zugeordnet und die Gesamthydrophobizität der Signalpeptide bestimmt (Kyte und Doolittle 1982). Je höher dieser Score liegt, desto hydrophober ist das Signalpeptid (Kyte und Doolittle 1982). Der GRAVY-Score wird definiert als:

$$\text{GRAVY} = \sum_{i=1}^{20} \alpha_i f_i$$

wobei  $f_i$  das Maß der Frequenz einer Aminosäure  $i$  im Signalpeptid ist und  $\alpha_i$  der Hydropathie Index der Aminosäure ist (Kyte und Doolittle 1982).

## **VI.10 Molekularbiologische Methoden**

### **VI.10.1 Herstellung hitzekompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$**

LB-Medium (20 ml) wurde mit einer Kolonie *E. coli* DH5 $\alpha$  inokuliert und über Nacht wachsen gelassen (37°C, 160 rpm). Am nächsten Tag wurde 25 ml LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 160 rpm wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> = 0,5 bis 0,7 geerntet (4000 rpm, 4°C, 6 min), in 8,5 ml kaltem und sterilem TFPI pH 5,8 (30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10% (w/v) Glycerol) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 6 min) und in 1 ml kaltem und sterilem TFPII pH 6,5 (10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 10 mM MOPS) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden zu 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **VI.10.2 Transformation hitzekompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$**

Nachdem die kompetenten DH5 $\alpha$  (VI.10.1) auf Eis aufgetaut wurden, wurde die zu transformierende Plasmid-DNA zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend 700  $\mu$ l vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 1 h, bei 37°C und 900 rpm im Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 1 min bei 10000xg pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde im verbleibenden LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) ausplattiert. Die Platte wurde anschließend ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **VI.10.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde die Agarose in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eingewogen und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Danach wurde 1x TAE (50x TAE: 2 M Tris, 50 mM EDTA, 5,71% Eisessig) und EtBr zugegeben und das Gel in die dafür vorgesehene Einrichtung gegossen und der Kamm eingefügt. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde es mit 1x TAE-Puffer übergossen und die Proben aufgetragen. Um die DNA aufzutrennen wurde das Gel bei 100 V angeschlossen und so lange laufen gelassen bis die Bromphenolblaubande 2/3 des Gels erreichte. Anschließend wurden die Banden des Gels bei 302 nm dokumentiert.

## VI.10.4 Ligation von Plasmid-DNA

20 ng dephosphorylierte, geschnittene und geextrahierte Plasmid-DNA wurden mit 5 U T4-Ligase und einem Überschuss an geschnittenem Insert bei 37°C für 1 h im Thermomixer inkubiert, bei 80°C inaktiviert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert (VI.10.2).

## VI.10.5 Restriktion von Plasmid-DNA und Amplikons

Plasmid-DNA (4 µg) wurden mit 2 U des jeweiligen Restriktionsenzym für 2 h bei optimalen Bedingungen (lt. Hersteller) verdaut.

## VI.10.6 Ortsgerichtete Mutagenese nach dem Quickchange Protokoll von Stratagene

Die Primer wurden nach den Parametern des Quickchange Protokoll von Stratagene und mit PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>) hergestellt. Die Annealingtemperaturen ( $T_M$ ) sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die PCR-Reaktion wurde mit der HiFi-Kapa-Polymerase von Peqlab nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<b>Initiale</b>	95°C	5 min	
<b>Denaturierung</b>			
<b>Denaturierung</b>	98°C	20 s	27 x
<b>Primer</b>	$T_M$	15 s	
<b>Annealing</b>			
<b>Extension</b>	72°C	3 min	
<b>Finale Extension</b>	72°C	5 min	

Alle Mutationen wurden im bakteriellen pUC19-Vektor durchgeführt. Durch seine Größe und Transformationseffizienz stellt dieser einen geeigneter Vektor für die Mutagenese dar.

### **VI.10.7 Gelextraktion**

DNA wurde in einem 0,7%igen TAE-Agarose-Gel aufgetrennt (VI.10.3). Anschließend wurde die gewünschte Bande mit einer Hand-UV-Lampe (302 nm) detektiert und mit einem sauberen und scharfen Skalpell ausgeschnitten. Die Agarosestücke wurden gewogen und für je 100 mg Gel in 3 Vol Solubilization Solution für 10 min bei 60°C gelöst. Anschließend wurde 1 Vol Isopropanol zugegeben und gemischt. Die Säule wurde in ein 2 ml Reagiergefäß gegeben, mit 500 µl Preparation Solution äquilibriert und bei 13000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 700 µl solubilisierter Gel-Lösung beladen und erneut für 1 min bei 13000xg zentrifugiert. Diese Schritte wurden so lange wiederholt bis das gesamte Volumen des Ansatzes aufgetragen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl Wash Solution gewaschen, bei 13000xg für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um den verbleibenden Ethanol zu entfernen, wurde erneut bei 13000xg für 1 min zentrifugiert und die Säule anschließend in ein neues 2 ml Reagiergefäß übertragen. Dann wurde die linearisierte Plasmid-DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert.

### **VI.10.8 Präzipitation von pDNA**

Zu der zu fällenden DNA wurden 0,1 Vol NaAc pH 5,2 und 2,5 Vol EtOH (Fragmente > 500 bp) oder Isopropanol (Fragmente ≤ 500 bp) zugegeben. Anschließend wurde die DNA präzipitiert und zweimal mit 70% EtOH gewaschen. Das Pellet wurde dann getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.

### **VI.10.9 Basische Phenolextraktion zur DNA-Isolation**

Zum Entfernen störender Salze und Proteine wurde die DNA einer basischen Phenolextraktion unterzogen.

Zu dem Ansatz wurde 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und anschließend leicht geschüttelt. Nachdem die Proben für 1 min bei 14000xg und RT zentrifugiert wurden, wurde die wässrige Phase in ein neues Reagiergefäß überführt. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis kein denaturiertes Protein in der Interphase mehr zu erkennen war. Anschließend wurde ein 1 Vol Chloroform zugegeben und bei 14000xg, 1 min bei Raumtemperatur

zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reagiergefäß gegeben. Danach wurde die DNA präzipitiert (VI.10.8) und das Pellet in Wasser gelöst.

### **VI.10.10 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Geschnittene und gelextrahierte Plasmid-DNA (20 ng) wurde mit 2 U SAP bei optimalen Bedingungen (laut Hersteller) für 2 h und 37°C dephosphoryliert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 15 min bei 65°C inaktiviert und zur Ligation (VI.10.4) verwendet.

### **VI.10.11 Hitzetransformation von Hefen**

Eine Übernachtskultur (2 ml) wurden für 2 min bei 3000rpm (Eppendorf MiniSpin) zentrifugiert und mit 1 ml LiAc/TE-Puffer (100 mM LiAc pH 7,5, 1x TE) gewaschen. Anschließend wurde bei 3000 rpm für 2 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl LiAc/TE-Puffer resuspendiert. Dann wurden 20 µl denaturierte Lachs-Carrier-DNA (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O), die zu transformierende Plasmid-DNA und 500 µl PEG-Lösung (1x TE, 1x LiAc, ad. 50% PEG4000) zugegeben. Nach der Zugabe von 50 µl 1 M LiAc pH 7,5 wurden die Hefen bei 30°C für 1 h inkubiert und dann 20 µl DMSO zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 42°C transformiert und für 2 min bei 3000 rpm pelletiert. Schließlich wurden die Hefen 2x mit 1 ml 1x TE-Puffer pH 7,5 (10x TE: 100 mM TrisCl, 10 mM EDTA) gewaschen und in 100 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

### **VI.10.12 Zufallsmutagenese durch Error-Prone PCR**

Zur Mutagenese wurden dem PCR-Ansatz das Schwermetallsalze MnCl<sub>2</sub> zugegeben und die Nukleotide dTTP und dCTP in erhöhter Konzentration zugegeben. Durch die störende Wirkung des MnCl<sub>2</sub> und der Konzentrationsunterschiede der Nukleotide erhöht sich die Fehlerrate der DNA-abhängigen DNA-Polymerase und es entstehen zufällige Mutationen. Die Error-Prone-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<b>Komponente</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>
TAQ-Puffer	10x	1x
dNTP-Mix	2 mM	0,2 mM
Primer fwd	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M
Primer rev	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M
Mutagenesepuffer	5x	2x
<i>sec61Var</i> -pUC19	50 ng	1 ng/ $\mu$ l
TAQ-Polymerase	5 U/ $\mu$ l	0,025 U/ $\mu$ l
ad 50 $\mu$ l mH <sub>2</sub> O		

Die PCR wurde nach folgendem Temperaturverlauf durchgeführt:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklus</b>
Initiale Denaturierung	95	3 min	1x
Denaturierung	95	30 s	
Annealing	T <sub>M</sub>	30 s	35x
Extension	72	45 s	
Finale Extension	72	10 min	1x

Die Schmelztemperatur T<sub>M</sub> betrug für *sec61N*- 60°C, für *sec61L7*- 53°C, für *sec61L8*- 50°C und für *sec61C*-pUC19 55°C.

## **VI.11 Biochemische Methoden**

### **VI.11.1 SDS-PAGE und Western-Blot**

Die SDS-Gele wurden in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 500 ml 1x MOPS-Puffer beladen. Die denaturierten Proben wurden in die vorherbestimmte Spur aufgetragen und das Gel bei 80 V gestartet. Nachdem der Marker das Trenngel erreichte, wurde die Voltzahl auf 150-170 V erhöht und solange weitergeführt bis die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Gels erreichte.

Danach wurde der Western-Blot aufgebaut indem Schwämme, Whatman-Papier und Nitrocellulosemembran in Transferpuffer (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l Glycin, 20% MeOH, 0,4 g/l SDS) äquilibriert wurden und von unten nach oben eine Schicht Schwamm, drei Schichten Whatman-Papier, die Nitrocellulosemembran, das

Gel, erneut drei Schichten Whatman-Papier und zuletzt ein weiterer Schwamm in die vorgesehenen Kassetten eingespannt wurden. Danach wurde der Aufbau in die Blotkammern eingesetzt, sodass die Gelseite der Kathode zugewandt ist und die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Danach wurde für 2 h bei 300 mA und 4°C geblottet. Die Nitrocellulosemembran wurde kurz mit TBS-T (1x TBS mit 0,1% Tween-20; 10x TBS pH 7,5: 500 mM Tris, 1,5M NaCl) gewaschen und in 5% Milchpulverlösung für 1 h geblockt (5% (w/v) Milchpulver in TBS-T). Danach wurde die Membran für 2 h mit primären Antikörpern (in Blotto: 2% (w/v) Milchpulver in TBS-T, 0,05% Natriumazid) inkubiert und danach 2x 10 min mit Blotto (2% Milchpulver in TBS-T) gewaschen. Anschließend wurde die Membran 2x 10 min in TBS-T gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (in 1x TBS-T) inkubiert. Dann wurde die Membran mit Luminol (lt. Hersteller) benetzt und die Proteine auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

### **VI.11.2 Cycloheximid-Chase**

Zum Zeitpunkt  $t=0$  wurde Cycloheximid in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben und in einem definierten Zeitintervall eine konstante  $OD_{600}$  entnommen. Die Probennahme erfolgte wie in VI.11.4 beschrieben, aber der Waschschrift wurde nicht mit  $H_2O_{dest.}$  sondern mit Tris-Azid (VI.11.12) durchgeführt. Cycloheximid inhibiert die Translation von Proteinen, so dass die Abbaurate eines definierten Proteinpools im zeitlichen Verlauf beobachtet werden kann.

### **VI.11.3 Präparation von Hefemikrosomen**

Eine Flüssigkultur wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von maximal 3 bei 30°C wachsen gelassen und anschließend bei 4650xg für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zu einer 100x  $OD_{600}$  in 100 mM Tris-Cl pH 9,4 mit 10 mM DTT resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4650xg für 5 min bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 70 ml Lytikasepuffer (0,7 M Sorbitol; 0,5% Glc; 50 mM TrisCl pH 7,4; 10 mM DTT, ad YP) mit 8 ml Lytikase resuspendiert und für 30 min bei 30°C und 80 rpm inkubiert. Danach wurde bei 4650xg zentrifugiert und zu 250x  $OD_{600}$  in 2x JR-Puffer (0,4 M Sorbitol 100 mM KAc 4 mM EDTA, 40 mM HEPES pH 7,4) gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet zu 500x  $OD_{600}$  in 2x JR-Puffer aufgenommen und für mindestens 45 min bei -80°C eingefroren. Der Ansatz wurde

in kaltem Wasser aufgetaut und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  mit 1 mM DTT und 1 mM AEBSF zugegeben. Je 15 ml wurden in einem Potter-Homogenisator zu 10 Zyklen bei 2000 rpm aufgeschlossen und grobe Zelltrümmer bei 1090xg für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 37000xg für 15 min und 4°C zentrifugiert und das Pellet in B88-Puffer resuspendiert. Danach wurde ein Zwei-Stufen Sucrosegradient aus 1,5 M Sucrose und 1,2 M Sucrose (20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM KOAc, 2 mM EDTA) mit 500  $\mu\text{l}$  beladen und bei 50000 rpm für 70 min bei 4°C (Optima L-90K/SW55Ti) ultrazentrifugiert. Die Interphase zwischen der 1,5 M und 1,2 M Sucroseschicht wurde vorsichtig abgenommen, mit B88-Puffer (20 mM HEPES pH 6,8, 250 mM Sorbitol; 150 mM KAc und 5 mM MgAc) gewaschen und bei 37000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in B88-Puffer resuspendiert und die  $\text{OD}_{280}$  1:100 in 2% SDS bestimmt und die Mikrosomen auf eine  $\text{OD}_{280} = 50$  (1 eq) eingestellt. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

#### **VI.11.4 Herstellung von Ganzzellextrakten aus Hefen**

Hefen (30 ml) wurden zu  $\text{OD}_{600} = 0,02$  angeimpft, anschließend zu 10 ml aufgeteilt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (20°C, 30°C, 37°C). 10  $\text{OD}_{600}$  wurde den Kulturen entnommen und bei 9000xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gewaschen, bei 9000xg für 5 min zentrifugiert und in 100  $\mu\text{l}$  Probenpuffer mit 200 mM DTT resuspendiert. Anschließend wurden die Proben in einem Beadbeater für 2x 90 s bei 4°C aufgeschlossen, kurz zentrifugiert, für 10 min bei 65°C für transmembrane Proteine oder 5 min bei 95°C für lösliche Proteine denaturiert und bei 14100xg bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß pipettiert und anschließend die Proben in einer SDS-PAGE und im Western-Blot (VI.11.1) analysiert.

#### **VI.11.5 TCA-Fällung**

$\frac{1}{4}$  Volumen eiskaltes 50%iges TCA wurde zur Probe gegeben und für 15 min bei 4°C auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 15 min bei 4°C und 13200xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml Aceton gewaschen. Anschließen wurde erneut für 10 min zentrifugiert, 3x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT zugegeben und die Proben bei denaturiert, wie in VI.11.4 beschrieben.

Verfärbte sich der blaue SDS-Probenpuffer gelb, so wurde solange 1 M TrisCl pH 8,8 zugegeben bis der saure pH neutralisiert wurde.

### **VI.11.6 Lytikasepräparation**

LB-Medium (10 l) wurden mit einer ü.N.-Kultur des Bakterienstammes KRB3 (RSB805) angeimpft und die Induktion mit 0,5 mM IPTG sofort initiiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C.

Nach 5 h bei 37°C und 200 rpm wurden die Bakterien für 10 min, 4200 rpm und 4°C pelettiert und mit 150 ml 25 mM TrisHCl pH 7,4 gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 8000 rpm wurden die Bakterien in 200 ml 25 mM TrisCl pH 7,4 aufgenommen und EDTA in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Anschließend wurden 200 ml 40% Sucroslösung (in TrisHCl pH 7,4) zugegeben und für 20 min vorsichtig auf dem Magnetrührer gemischt. Die Zellen wurden anschließend bei 8000 rpm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und die Sucrose vollständig entfernt. Danach wurde das Pellet in 50 ml 0,5 M MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und erneut vorsichtig für 20 min auf dem Magnetrührer gemischt. Anschließend wurde für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit der Lytikase zu 10 ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Qualität der Präparation und die Aktivität wurden ermittelt, indem Hefen bei einer OD<sub>600</sub>= 2 für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 mM Tris-HCl pH 9,4 mit 10 mM DTT aufgenommen und für 10 min inkubiert wurde. Danach wurde erneut für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50 mM Tris pH 7,5 mit 10 mM DTT zu einer OD<sub>600</sub>= 2 resuspendiert und mit verschiedene Mengen Lytikase inkubiert. Aus der Abnahme der OD<sub>600</sub> konnte dann die Aktivität bestimmt werden.

### **VI.11.7 Säulenchromatografische Aufreinigung der Untereinheiten des Sec-Komplex**

Mikrosomen (7500 eq) wurden bei 17500 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Evolution/ SS-34) und das Pellet in Lösung I (50 mM Hepes-KOH pH 7,4, 400 mM Kaliumacetat, 8 mM Magnesiumacetat, 1x Proteaseinhibitor, 10% Glycerol, 2 mM DTT) mit 2,5% Digitonin für 30 min durch langsames rotieren solubilisiert. Die Membranen wurden für 1 h und 4°C für 70000 rpm ultrazentrifugiert (TLA-100.3) und der Überstand mit Lösung I ohne Digitonin auf eine Digitoninkonzentration von 1% verdünnt. Auf eine vorbereitet Anti-HA-Säule wurden die solubilisierten Membranen

aufgetragen und ü.N. bei 4°C auf einem Rad rotiert. Am nächsten Tag wurde die Säule 2x mit 10 ml Lösung II (Lösung I mit 1% Digitonin ohne Glycerol) und dreimal mit 1x TBS gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit 4 ml 250 mM Glycin-HCl pH 2,5 eluiert und in einem Falcon mit 440 µl vorgelegtem TrisCl pH 9,4 aufgenommen und das Eluat auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Ansatz mit TCA gefällt (VI.11.5) und das Pellet in 40 µl 3x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT aufgenommen und für 10 min bei 65°C denaturiert. Danach wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel fixiert, indem das Gel 15 min in Fixierlösung I (10% Eisessig, 40% MeOH, 1% Glycerol) und 30 min in Fixierlösung II (50% MeOH, 1% Glycerol) inkubiert wurde.

### **VI.11.8 Tryptischer in-Gel Verdau**

Die gewünschten Banden werden mit einem sauberen und scharfen Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wird zweimal 15 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, zweimal 15 min mit 50% Acetonitril und einmal mit 100% Acetonitril gewaschen. Die SDS-Stücke werden dann 15 min getrocknet und 20 µl Trypsinlösung zugegeben (20 ng/µl). Die SDS-Stücke werden dann Quellen gelassen, bei Bedarf 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer zugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird der Überstand (Ü1) gesammelt, die Gelstücke mit 30 µl H<sub>2</sub>O überschichtet und für 15 min bei RT geschüttelt. Nachdem Ü1 mit dem Überstand (Ü2) vereint wurde, werden die Gelstücke mit 60% Acetonitril mit 1% TFA überschichtet, 15 min unter schütteln inkubiert und der Überstand (Ü3) mit Ü1/2 vereint. Danach werden die Gelstücke mit 100% Acetonitril mit 0,1% TFA überschichtet, 15 min geschüttelt und der Überstand (Ü4) mit Ü1/2/3 vereint. Proben werden zur Lagerung bei -20°C aufbewahrt oder direkt einer MALDI-Analyse unterzogen.

### **VI.11.9 Anlegen von Glycerolkulturen**

Eine Bakterienkultur (1656 µl) mit OD<sub>600</sub>= 1 wurden mit 344 µl 87%igem sterilem Glycerol in ein Kryotube pipettiert und bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung von Hefen wurden 1540 µl einer Hefekultur mit 460 µl 87%igem sterilem Glycerol in ein Kryotube gegeben und bei -80°C eingefroren.

### **VI.11.10 Droptest**

Die Anzahl der Hefen der zu untersuchenden Stämme wurden mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und Verdünnungen mit  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und  $10^1$  Zellen in 5  $\mu$ l hergestellt. Je 5  $\mu$ l der Verdünnungsreihe wurden auf YPD oder auf YPD mit Tunikamycin (0,25  $\mu$ g/ml oder 0,5  $\mu$ g/ml) oder 5 mM EGTA aufgetropft und für die angegebenen Tage bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

### **VI.11.11 UPR- $\beta$ -Galaktosidaseassay**

*SEC61* und mutierte Zellen wurden mit pJC30 (LacZ) or pJC31 (UPRELacZ) transformiert, die Hefen über Nacht bis zur frühen log-Phase in -Trp wachsen gelassen und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt (Belden und Barlowe, 2001). Die Zellen (2 ml) wurden durch Zentrifugation geerntet, in 1 ml Z-Puffer resuspendiert (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.27% mercaptoethanol) und die Hefen mit 100  $\mu$ l Chloroform, 50  $\mu$ l 0.1% SDS und durch vortexen für 10 s lysiert. Die Suspension wurde für 5 min bei 28°C vorinkubiert und 200  $\mu$ l ONPG zugegeben. Nach 30 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 700  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  abgestoppt und die Absorption bei 420 nm bestimmt. Aus der Absorption wurden anschließend die Miller-Units berechnet (Miller, 1972). Zur Kontrolle wurden die Hefen für 1 h mit Tunikamycin (2  $\mu$ g/ml) behandelt und *sec61-3*-Hefen für 1,5 h bei 20°C inkubiert.

### **VI.11.12 $^{35}\text{S}$ -Pulse-Chase Analyse**

Minimalmedium (30 ml) wurde zu  $\text{OD}_{600} = 0,005$  angeimpft und bei einer  $\text{OD}_{600} \sim 0,5-1$  für 5 min bei 4650xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Labelling-Medium gewaschen und zu 4  $\text{OD}_{600}$ /ml aufgenommen. Die Hefen wurden zu 250  $\mu$ l aliquotiert und 20 min bei 30°C und 400 rpm in Labelling-Medium ausgehungert. Nachfolgend wurden die Hefen 5 min mit 55  $\mu$ Ci  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys-Promix (PerkinElmer) radioaktiv markiert, mit 250  $\mu$ l 2x Chase-Mix (10x Chase-Mix: 3 mg/ml Cys, 4 mg/ml Met, 13,2 mg/ml  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) abgestoppt und nach definierten Zeitintervallen mit kaltem Tris-Azid (20 mM TrisHCl pH 7,5, 20 mM Natriumazid) behandelt. Der Chase-Mix enthält Methionin und Cystein im Überschuss und unterbindet damit eine ungewollte Fortführung des Labelling. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4°C), mit 1 ml Tris-Azid und anschließend mit 1 ml

Resuspensionspuffer (100 mM TrisHCl pH 9,4, 10 mM DTT, 20 mM Natriumazid) gewaschen und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, in 150 µl Lysepuffer (20 mM TrisHCl pH 7,5, 2% SDS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen und ½ Vol Glassbeads zugefügt. Die Zellen wurden zweimal 1 min im Beadbeater aufgeschlossen und dazwischen für 1 min gekühlt. Anschließend wurden die Glasperlen abzentrifugiert und die Proteine für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Glasperlen wurden dreimal mit 250 µl IP-Puffer ohne SDS gewaschen und die Überstände gesammelt.

Danach wurde das gewünschte Protein in einer IP gefällt. Die gesammelten Überstände wurden in einem Preclear mit 60 µl ProteinA-Sepharose für 30 min durchgeführt und von unspezifisch bindenden Proteinen befreit. Die ProteinA-Sepharose wurde danach zentrifugiert und CPY\*, KHN, KWW mit 60 µl ProteinA-Sepharose, 6 µl spezifischer Antikörper ü.N. bei 4°C gefällt. Die ProteinA-Sepharose wurde zentrifugiert und zweimal mit IP-Puffer, einmal mit Urea-Wash, einmal mit ConA-Wash und einmal mit Tris-NaCl gewaschen. Die ProteinA-Sepharose wurde anschließend mit 200 mM DTT in 6x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C (10 min bei 65°C für KWW) erhitzt und in einer SDS-PAGE analysiert.

### **VI.11.13 Pulse Analyse zur Bestimmung der DPAPB-Akkumulation**

Hefen wurden vorbereitet wie in VI.11.12 beschrieben und 15 min bei 20°C markiert. Danach wurden die Zellen mit Tris-Azid behandelt um eine weitere Inkorporation radioaktiver Nuklide zu verhindern. Die abgetöteten Zellen wurden aufgeschlossen wie in der Pulse-Chase Analyse (VI.11.12) und anschließend für 10 min bei 65°C denaturiert. Die Glasperlen wurden dreimal mit 250 µl IP-Puffer ohne SDS gewaschen und die Überstände gesammelt. Dann wurde das gewünschte Protein in einer IP gefällt (VI.11.12) und für 10 min bei 65°C erhitzt. Die IP wurde schließlich in einer SDS-PAGE untersucht.

### **VI.11.14 RAMP-Analyse zur strukturellen Integrität des Sec61-Komplex im linearen Sucrosegradienten**

Zur Herstellung des Gradienten wurden je 1 ml 15%, 10%, 5% und 0% Sucroslösung (in 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 500 mM KAc; 1 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 0,05% β-mercaptoethanol; 1 mM PMSF und 1x PI) geschichtet und für

mindestens 6 h bei Raumtemperatur stehen lassen. Durch Diffusion entsteht nach dieser Zeit ein linearer Gradient.

50 eq Mikrosomen wurden für 1 min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Solubilisierungspuffer (100 µl 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 500 mM KAc; 1% Triton X-100; 10 mM EDTA; 0,05% (v/v) β-mercaptoethanol; 1 mM PMSF und 5x PI) resuspendiert und anschließend 15 s gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der 0-15%ige Sucrosegradient mit den solubilisierten Membranen beladen und für 16 h bei 4°C und 40000 rpm (SW55Ti) zentrifugiert. Von oben beginnend wurden 13 Fraktionen zu je 310 µl entnommen und mit TCA gefällt. Die Pellets wurden in 40 µl 3x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT resuspendiert, bei 65°C für 10 min denaturiert und 2 µl in SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

### **VI.11.15 Untersuchungen zum freien und zum Sec-Komplex Proteinpool**

Mikrosomen (50 eq) wurden in 100 µl Digitoninpuffer (50 mM HEPES-KOH pH 7,4; 400 mM KAc; 5 mM MgAc; 10% (w/v) Glycerol; 0,05% (v/v) β-Mercaptoethanol, 1x PI) resuspendiert und anschließend für 30 min in 400 µl Digitoninpuffer mit 3,75% Digitonin solubilisiert. Der Ansatz wurde dann bei 10000xg, 4°C und 10 min zentrifugiert um nicht solubilierte Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet erneut mit 3,75% Digitonin in Digitoninpuffer solubilisiert. Nach der Zentrifugation (10000xg, 4°C, 10 min) wurde der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt und für 90 min bei 4°C und 200000xg (TLA120.1) zentrifugiert um die RAMP-Fraktion zu pelletieren. 150 µl des Überstandes (Digitoninextrakt) wurden mit TCA gefällt (VI.11.5) und in 50 µl 3x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT aufgenommen. Weitere 150 µl des Überstandes wurden mit 450 µl Digitoninpuffer ohne Digitonin aufgefüllt und glykosylierte Proteine mit 50 µl ConA für 1 h oder ü.N. gefällt. Anschließend wurden die Sepharose-Beads bei 2500xg für 2 min zentrifugiert und die freie Fraktion im Überstand zur Kontrolle erneut mit 100 µl ConA-Sepharose gefällt. Die Beads wurden dreimal mit Äquilibriumspuffer (1% (w/v) Digitonin; 50 mM HEPES-KOH pH 7,4; 10% (w/v) Glycerol; 0,05% (v/v) β-mercaptoethanol, 1x PI) gewaschen und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde anschließend in 50 µl 3x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT resuspendiert und für 10 min bei 65°C erhitzt. Nach der zweiten Fällung wurde der Überstand mit der freien Fraktion mit

50% TCA gefällt (VI.11.5) und nach dem Waschen in 50  $\mu$ l 3x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT resuspendiert und denaturiert.

# VII. Ergebnisse

## VII.1 Anpassung sekretorischer Signalpeptide und Transmembrandomänen in ihrer Funktion bei niedrigen Temperaturen

### VII.1.1 Konservierte Bereiche in SecY-Homologen aus psychrophilen und mesophilen Eubacteria

Analysiert wurden die Genome von *Psychromonas ingrahamii* 37, *Polaribacter irgensii* 23-P, *Collwellia psycherythraea* 34H, *Polaribacter haloplanktis* TAC125, *Escherichia coli* str. K-12 substr. W3110, *Vibrio cholerae* O395, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c, *Pseudoalteromonas tunicata* D2, *Polaribacter spec* MED152 und *Flavobacterium johnsoniae* UW101 (Riley *et al.*, 2008; Gosink *et al.*, 1998; Methe *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*; 1995; Thomas *et al.*, 2008; Holmström, 1998). *Thermotoga maritima* wurden als Beispiel für Proteinsekretion am anderen Ende der Temperaturskala in die Analyse einbezogen (Nelson *et al.*, 1999).

Ein Alignment der SecY-Homologe dieser Auswahl Extremophiler und Mesophiler zeigt, dass TMD 2a, 4 und 10 und die Loops zwischen TMD 6/7 und 8/9 stark konserviert sind (Abbildung 6 und Abbildung 7).



Abbildung 6: Alignment von *E. coli* und *V. cholerae* im Vgl. zu den Psychrophilen Bakterien dieser Studie. Konservierte Aminosäuren werden in grün angezeigt und nicht konservierte rot. Die Aminosäuren des kontraktiven Rings wurden mit grau hinterlegt. Zum besseren Überblick wurden TMD und helikale Bereiche aus van den Berg *et al.* (2004) einbezogen. Ec= *Escherichia coli*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Cp= *Collwellia psycherythraea* und Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*.

Der hydrophobe Ring des prokaryontischen SecY-Kanals wird in allen Bakterien durch Ile gebildet (grau hervorgehoben), was nahelegt, dass die Interaktionen des hydrophoben Kerns mit den Signalpeptiden und Transmembrandomänen in psychrophilen Bakterien konserviert sind (Abbildung 6). Aminosäurereste u.a. im Plug oder dem hydrophoben Ring, welche die Orientierung des Substratproteins im Kanal bestimmen (F25, T59, N65, L72, A79, I86, I91, Q93, T96, I133, T168, G175, I191, E238, K268, P276, F331, A334, A351, I408, A418, I61, F64, S68) wurden in Sec61p von *S. cerevisiae* identifiziert (Junne *et al.*, 2007; Trueman *et al.*, 2012). Sie befinden sich in vielen unterschiedlichen Teilen des Moleküls und ihre individuellen Funktionen sind unbekannt. Die äquivalenten Positionen dieser Reste sind konserviert zwischen *E. coli*, *V. cholerae* und den Psychrophilen, was bedeutet, dass im Laufe der Evolution keine Änderung in Bezug auf die Interaktionen, die die Orientierung des Substratproteins beeinflussen, stattgefunden hat (Abbildung 6 und Abbildung 7).

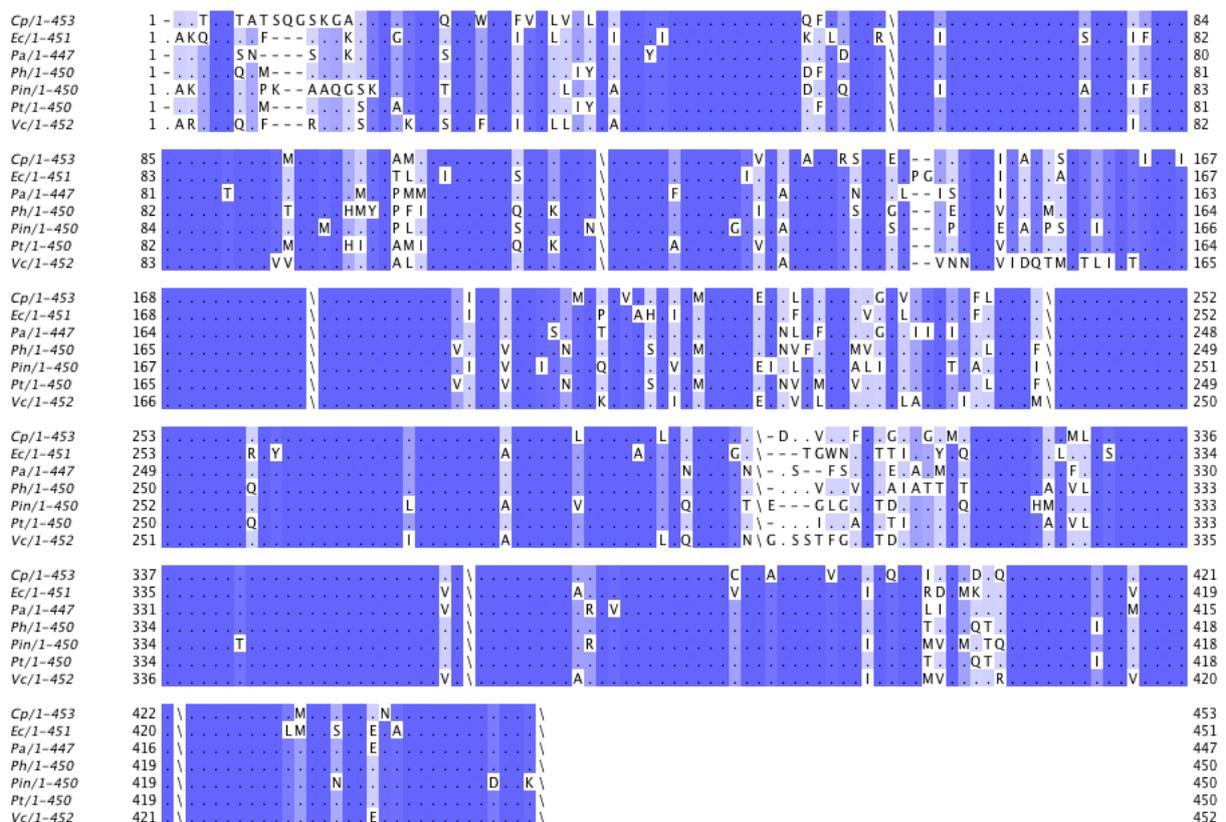


Abbildung 7: Alignment von SecY-Homologen aus *E. coli*, *V. cholerae* und den psychrophilen Bakterien *P. ingrahamii*, *C. psycherythraea* und *P. haloplanktis*. Das Alignment wurde mit ClustalW 2.0 durchgeführt und mit Jalview bearbeitet. Konservierte Bereiche werden dunkelblau angezeigt. Bakterien der CFB-Gruppe und der hyperthermophile Vertreter *T. maritima* wurden nicht berücksichtigt. Ec= Escherichia coli, Vc= Vibrio cholerae, Pin= Psychromonas ingrahamii, Cp= Colwellia psycherythraea, Ph= Pseudoalteromonas haloplanktis.

Die Konservierung von SecY zwischen *E. coli* und *T. maritima* war zu gering, weshalb auf ein Alignment verzichtet wurde. Wegen der mangelnden Konservierung zwischen den Bakterien der CFB-Gruppe (Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides-Gruppe) und den anderen Bakterien, wurden die CFB-Gruppe einem separaten Alignment unterzogen (Abbildung 8). Das Alignment bestätigt auch für die CFB-Gruppe eine hohe Konservierung (Abbildung 8).

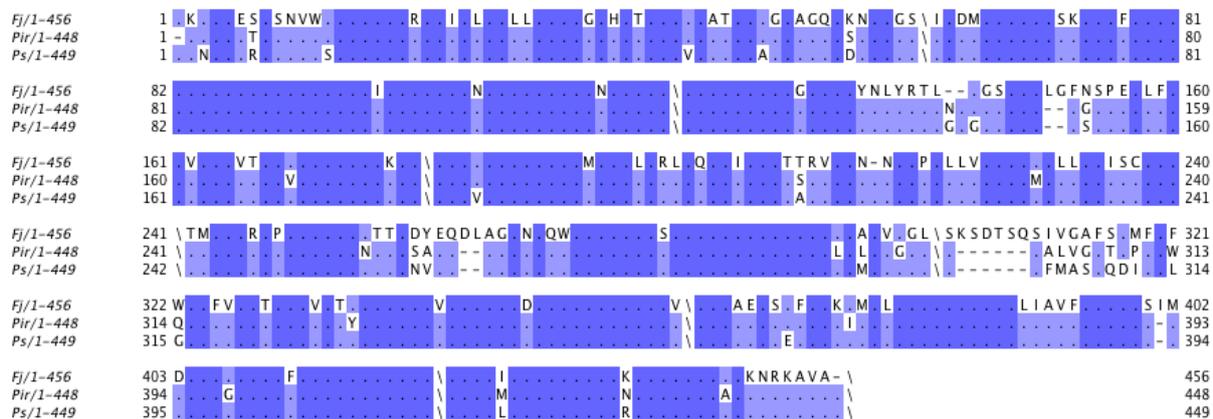


Abbildung 8: Alignment von SecY-Homologen der mesophilen und psychophilen Vertreter der CFB-Gruppe. Das Alignment wurde mit ClustalW 2.0 durchgeführt und mit JalView bearbeitet. Konservierte Bereiche werden dunkelblau angezeigt. Fj= Flavobacterium johnsoniae, Pir= Polaribacter irgensii, Ps= Polaribacter spec MED152.

Das Alignment legt nahe, dass bisher bekannte funktionale Bereiche von Sec61p hoch konserviert sind und keine besondere Anpassung an die Kälte entwickelt haben (Abbildung 8).

Aus diesem Grund wurden Signalpeptide nach Anpassungen an extrem niedrige Temperaturen untersucht und verschiedene Kriterien zwischen mesophilen und psychophilen Bakterien in den nachfolgenden Kapiteln verglichen

## VII.1.2 Die Signalpeptidlängen ähneln sich bei mesophilen und psychophilen Eubakteria

Um Unterschiede zwischen Signalpeptiden von psychophilen und mesophilen Prokaryonten zu identifizieren, wurden drei unterschiedliche Klassen von Signalpeptiden untersucht: klassische Signalpeptide (mit SignalP 3.0), Signalpeptide von Lipoproteinen (mit LipoP 1.0) und Tat-Signalpeptide (mit TatP1.0) (Nielsen *et al.*, 1997, Bendtsen *et al.*, 2004, Juncker *et al.*, 2003, Bendtsen *et al.*, 2005).

Tabelle 5: Durchschnittliche Länge von Signalpeptiden und Lipoproteinsignalpeptiden in psychrophilen und mesophilen Eubakteria. Verwandte Organismen wurden innerhalb der Tabelle untergruppiert und die durchschnittliche Länge beider Signalpeptidklassen in Aminosäuren [AS] angegeben. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien).

Organismus	durchschnittliche Länge der Signalpeptide [AS]	durchschnittliche Länge der Lipoproteinsignalpeptide [AS]
<i>P. ingrahamii</i>	24.93	20.38
<i>V. cholerae</i>	25.05	20.78
<i>P. irgensii</i>	23.30	19.21
<i>P. spec MED152</i>	21,08	19,19
<i>F. johnsoniae</i>	22.90	20.22
<i>P. haloplanktis</i>	24.44	19.89
<i>C. psychrerythraea</i>	25.47	20.77
<i>P. atlantica</i>	24,86	21,05
<i>P. tunicata</i>	22,75	19,99
<i>E. coli</i>	24.52	20.23
<i>T. maritima</i>	21.86	19.15

Die durchschnittliche Länge der mesophilen und psychrophilen Signalpeptide variierte zwischen 21,08 AS (*P. spec MED152*) und 25,47 AS (*C. psycherythraea*) für klassische Signalpeptide und 19,15 AS (*T. maritima*) bzw. 21,05 AS für Lipoproteinsignalpeptide (Tabelle 5). Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen psychrophilen und mesophilen Eubakterien bei der Betrachtung der Mittelwerte beobachtet (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu sind klassische Signalpeptide des hyperthermophilen *T. maritima* im Durchschnitt eindeutig kürzer als die der Meso- und Psychrophilen mit einer Länge von gerade mal 21,08 AS (*P. spec MED152*). Die durchschnittliche Länge der Lipoproteinsignalpeptide ist vergleichbar mit derjenigen der Mesophilen und Psychrophilen (Tabelle 5).

### VII.1.3 Die Signalpeptide der Psychrophilen sind nicht hydrophober als diejenigen der Mesophilen

Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der hydrophoben und ionischen Kräfte in der extremen Kälte einen ausreichend großen evolutionären Druck auf die AS-Komposition der Signalpeptide und damit auf die Hydrophobizität haben, wurden die klassischen Signalpeptide und die Lipoproteinsignalpeptide nach ihrer Spaltstelle ausgerichtet und die entstandene Konsensussequenz mit Weblogo dargestellt (Baldwin, 1986; Schneider *et al.*, 1990; Crooks *et al.*, 2004). Weblogo gibt die

Konservierung der Aminosäuren an einer gegebenen Position in bits an und stellt diese durch ihre relative Höhe dar (Schneider *et al.*, 1990; Crooks *et al.*, 2004). Herkömmliche Signalpeptide zeigen eine Bevorzugung von kleinen neutralen Aminosäuren (z. B. Ala) an Position -1 und -3, die die Erkennungssequenz der Signalpeptidase darstellt und in nahezu allen Organismen konserviert ist (von Heijne, 1983). *F. johnsoniae* und *P. irgensii*, beides Mitglieder der CFB-Gruppe, zeigen eine geringfügig niedrigere Konservierung der Position -3, was auch in *T. maritima* beobachtet werden konnte (Abbildung 9).

Der hydrophobe Kern der vorhergesagten Signalpeptide besteht in den meisten untersuchten Organismen aus Leucinen außer für *P. irgensii*, das Ile bevorzugt. Untersuchungen in Bezug auf Signalpeptide von Lipoproteinen zeigten keinen Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen (Abbildung 10).

Um versteckte Effekte auf die Hydrophobizität der Signalpeptide zu bestimmen, wurde eine GRAVY-Analyse durchgeführt (Kyte und Doolittle 1982). Der GRAVY-Score ist ein Maß für die Hydrophobizität der zu untersuchenden AS-Sequenz (Kyte und Doolittle 1982). Je höher dieser Wert, desto hydrophober sind die Signalpeptide (Kyte und Doolittle 1982). Die GRAVY-Werte für klassische Signalpeptide und Signalpeptide von Lipoproteinen sind sehr ähnlich, wobei die Hydrophobizität in psychrophilen im Vergleich zu mesophilen Eubakteria nicht verändert ist (Tabelle 6).

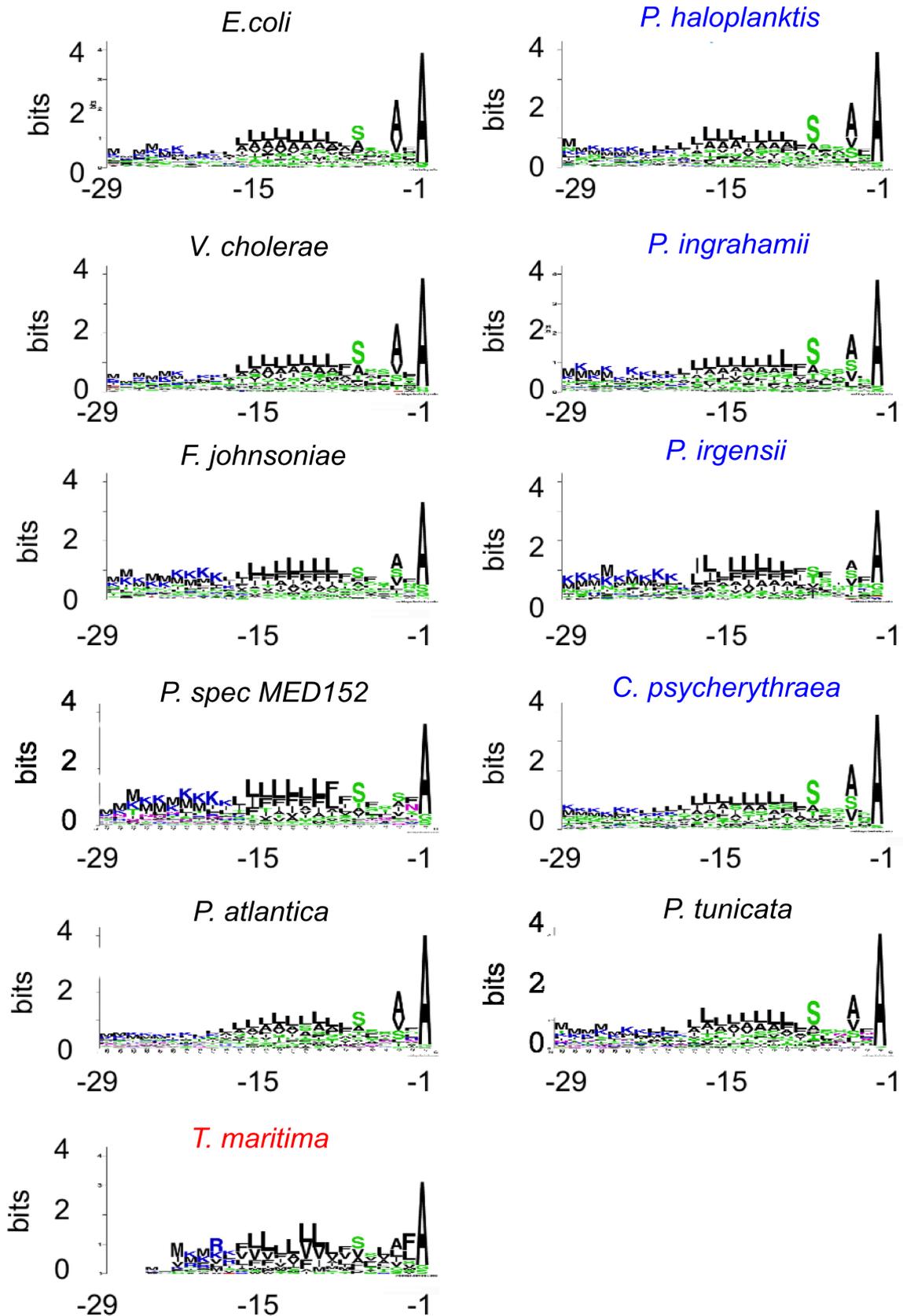


Abbildung 9: Vergleich der klassischen Signalpeptide mesophiler und psychrophiler Bacteria. Identifizierte Sequenzen wurden nach ihrer Schnittstelle ausgerichtet, einem Alignment unterzogen und mit Weblogo 2.0 zur besseren Übersicht dargestellt. Die Auftretenshäufigkeiten werden in bits und die Abstände zur Schnittstelle (-1) in Aminosäuren angegeben (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien).

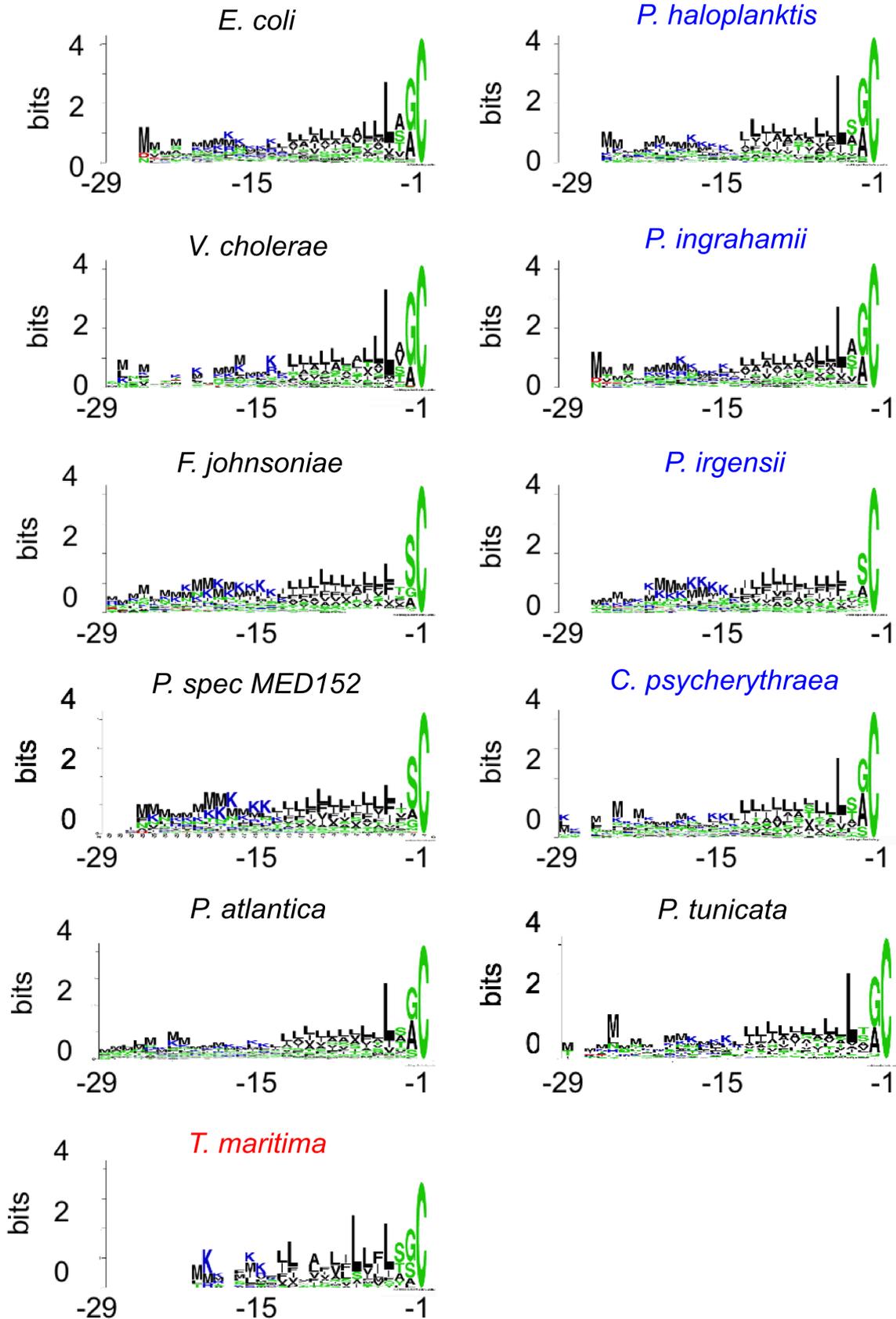


Abbildung 10: Vergleich der Signalpeptide von Lipoproteinen mesophiler und psychrophiler Bacteria. Identifizierte Sequenzen wurden nach ihrer Schnittstelle ausgerichtet, einem Alignment unterzogen und mit Weblogo 2.0 zur besseren Übersicht dargestellt. Die Auftretenshäufigkeiten werden in bits und die Abstände zur Schnittstelle (-1) in Aminosäuren angegeben (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien).

Die GRAVY-Werte und damit die Hydrophobizität der beiden Signalpeptidklassen sind in *T. maritima* substantiell höher (Tabelle 6).

Tabelle 6: GRAVY Analyse von klassischen Signalpeptiden und Lipoprotein-Signalpeptiden. Lipoprotein-Signalpeptide und klassische Signalpeptide wurden bioinformatisch bestimmt und die Hydrophobizität beider Signalpeptidklassen nach Kyte und Doolittle (1982) berechnet. Tat-Signalpeptide wurden, wegen der geringen Anzahl an repräsentativen Proteinen, die diese Art des Signalpeptids besitzen, nicht weiter berücksichtigt nicht weiter berücksichtigt. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien)

Organismus	Signalpeptide	Lipoprotein Signalpeptide
<i>P. ingrahamii</i>	1.16	1.40
<i>V. cholerae</i>	1.08	1.34
<i>P. irgensii</i>	1.27	1.52
<i>P. spec MED152</i>	1.34	1.59
<i>F. johnsoniae</i>	1.21	1.45
<i>P. haloplanktis</i>	1.21	1.49
<i>C. psychrerythraea</i>	1.15	1.41
<i>P. atlantica</i>	1.08	1.37
<i>P. tunicata</i>	1.20	1.46
<i>E. coli</i>	1.11	1.37
<i>T. maritima</i>	1.90	1.78

#### VII.1.4 Detaillierte Analyse der AS-Zusammensetzung

In einer aktuellen globalen Analyse konnte gezeigt werden, dass der Ile-Gesamtgehalt in Proteinen von *P. ingrahamii* im Vergleich zu *E. coli* und *V. cholerae* um 1,5% abweicht (Riley *et al.*, 2008).

Bezogen auf ihre Signalpeptide unterscheiden sich die zuvor erwähnten Bakterien in ihrem Ile-Gehalt zu 1,64-2,58%, was höher ist als derjenige der globalen Betrachtung (im gesamten Proteom: 1,49-1,52%). Riley *et al.* konnten zudem zeigen, dass auch der Gehalt an Lys (1,32-1,84%), Asn (0,97-1,02%), Phe (0,39-0,50%) und Tyr (0,2-0,31%) in *P. ingrahamii* (verglichen mit *E. coli* und *V. cholerae*) erhöht ist (Riley *et al.*, 2008 und Tabelle 7). Für Signalpeptide dieser drei Organismen sind die Auftretenshäufigkeiten z. b. von Lys (1,85-1,99%), Asn (1,16-1,30%), Phe (1,38-1,52%) und Tyr (0,31-0,58%) damit höher als im Proteom. Für Glu (0,23-0,43%) liegt der Anteil in Signalpeptiden niedriger als im gesamten Proteom.

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung von Signalpeptiden. Die Tabelle gibt den durchschnittlichen Prozentsatz der einzelnen Aminosäuren in klassischen Signalpeptiden an. Angaben in Prozent [%]. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*.

Org.	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Ser	Thr	Asp	Asn	Glu
<i>Pin</i>	2,55	13,86	5,49	18,51	7,55	10,97	6,82	0,19	3,42	0,13
<i>Vc</i>	3,01	16,06	5,81	17,67	5,25	10,81	6,61	0,25	2,12	0,56
<i>Pir</i>	1,85	11,25	5,62	17,08	10,11	8,54	6,83	0,00	3,77	0,36
<i>Ps</i>	1,57	9,02	4,87	17,87	9,53	8,54	5,83	0,03	3,56	0,17
<i>Fj</i>	2,33	10,65	5,57	17,20	8,69	8,54	5,61	0,22	3,86	0,30
<i>Ph</i>	2,44	16,04	5,91	18,29	6,89	11,38	6,76	0,11	3,16	0,15
<i>Cp</i>	2,11	13,47	5,90	17,55	7,72	12,31	7,92	0,09	3,86	0,15
<i>Pa</i>	3,21	14,96	6,33	16,50	5,98	11,38	6,76	0,16	3,12	0,20
<i>Pt</i>	2,43	15,36	6,57	18,57	6,12	11,38	6,76	0,16	2,89	0,23
<i>Ec</i>	4,23	18,07	6,47	17,12	5,14	8,86	5,75	0,17	2,26	0,36
<i>Tm</i>	2,28	10,05	15,98	22,37	6,39	5,94	2,74	0,46	0,46	0,00
	Gln	Cys	Met	Phe	Tyr	Trp	Lys	Arg	His	Pro
<i>Pin</i>	1,56	1,84	6,54	7,11	1,60	0,44	7,22	1,60	0,76	1,84
<i>Vc</i>	1,67	1,65	7,94	5,59	1,29	1,72	5,23	3,12	0,82	2,81
<i>Pir</i>	2,56	1,57	5,98	11,81	0,93	0,21	8,54	1,42	0,57	1,00
<i>Ps</i>	1,85	1,68	5,72	12,65	1,92	0,13	8,06	1,33	0,48	0,58
<i>Fj</i>	1,83	1,84	6,97	12,09	2,20	0,40	8,88	1,22	0,73	0,86
<i>Ph</i>	1,48	2,13	6,19	6,68	1,48	0,33	6,21	1,51	0,93	1,94
<i>Cp</i>	1,49	1,62	6,46	7,11	1,28	0,38	6,71	1,33	0,85	1,68
<i>Pa</i>	1,56	2,27	6,91	6,69	1,36	0,66	5,76	2,53	1,46	2,23
<i>Pt</i>	1,59	2,06	6,46	6,62	1,59	0,46	6,35	1,41	1,10	1,93
<i>Ec</i>	1,70	1,62	7,83	5,73	1,02	1,22	5,37	3,50	1,18	2,39
<i>Tm</i>	0,23	0,00	8,68	10,50	0,46	1,37	5,71	4,57	0,23	1,60

Um Unterschiede zu finden wurden die Auftretenshäufigkeiten der Aminosäuren in Signalpeptiden psychrophiler Bakterien und deren mesophilen Gegenstücken verglichen und die minimalen und maximalen Differenzen berechnet. Der Vergleich erfolgt unter Berücksichtigung der Verwandtschaftsverhältnisse, das bedeutet, dass

zuerst die Vertreter der CFB-Gruppe, dann der restlichen Prokaryonten verglichen wurden, und anschließend deren Minimum und Maximum berechnet wurde. Der kleinste Wert beider Minima bzw. der größte Wert beider Maxima wurde anschließend für die Auswertung berücksichtigt. Der Prozentsatz folgender Aminosäuren zeigt in beiden Gruppen eine Tendenz und ist gleich bis erhöht in psychophilen Signalpeptiden: Ile (0,58-2,58%), Ser (0,00-3,45%) und Thr (0,00-2,17%).

Für Lipoproteinsignalpeptide Psychrophiler im Vgl. zu Mesophilen wurden ähnliche Tendenzen wie für klassische Signalpeptide identifiziert. Ile (0,06-4,09%) ist genau wie Thr (0,00-2,80%) gleich oder erhöht in Signalpeptiden von Lipoproteine (Tabelle 8). Anders verhält es sich für Asp und Ser, die in Lipoproteinsignalpeptiden keine Tendenz aufweisen (Vgl. Mesophile gg. Psychrophile). Zusätzlich sind Met (0,08-1,99%) und Arg (0,05-2,01%) erniedrigt im Vergleich zu den mesophilen Prokaryonten (Tabelle 8).

*T. maritima*, der einzige hyperthermophile Vertreter in unserem Datenset, zeigt starke Unterschiede in der Aminosäureverteilung für Signalpeptide und Lipoproteinsignalpeptide im Vergleich zu den anderen untersuchten Organismen der unterschiedlichen Gruppen. *T. maritima* wurde mit allen mesophilen Vertretern verglichen, da keine nähere Verwandtschaft zu einem der Prokaryonten gegeben ist. In Signalpeptiden ist Met (0,74-2,96%), genau wie Arg (1,07-3,35%), anteilig höher (Tabelle 7). Weniger oft vertreten als in mesophilen Signalpeptiden sind Asn (1,66-3,40%), Tyr (0,56-1,74%), Thr (2,87-4,02%) und Ser (2,60-5,44%) (Tabelle 7). Zusätzlich ist der Prozentsatz von Val (9,41-11,11%) und Leu (3,80-5,87%) erhöht und der von Gln (1,33-1,62%) und Cys (1,62-2,27%) stark erniedrigt, verglichen mit den mesophilen Bakterien (Tabelle 7).

In thermophilen Lipoproteinsignalpeptiden zeigt sich, verglichen mit Mesophilen, ein gegensätzlicher Trend für Thr (2,07-3,55%). Die Aminosäuren Trp (0,15-1,10%), Val (1,17-2,77%), Leu (0,75-5,16%) sind erhöht und damit anders situiert als in mesophilen Bakterien (Tabelle 8). Außerdem zeigt die Analyse einen geringeren Prozentsatz von Cys (0,93-1,72%) und His (0,07-0,76%) thermophilen Signalpeptiden verglichen zum Mesophilen (Tabelle 8). Keine Veränderungen wurden für Met, Arg, Tyr und Ser beobachtet.

Extremophile tauschen andere Aminosäuren für Leu und Val aus, zwei lipophile Aminosäure (Kyte and Doolittle 1982).

Tabelle 8: Aminosäure Komposition von Lipoprotein Signalpeptiden. Die Tabelle gibt den durchschnittlichen Prozentsatz der einzelnen Aminosäuren in Lipoproteinsignalpeptiden an. Angaben in Prozent [%].(Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*.

Org.	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Ser	Thr	Asp	Asn	Glu
<i>Pin</i>	4,56	8,50	6,62	19,11	9,81	7,93	6,05	0,40	2,28	0,34
<i>Vc</i>	6,00	9,33	6,95	22,88	5,94	8,20	4,99	0,36	2,26	0,83
<i>Pir</i>	2,34	5,17	6,44	18,09	12,39	8,04	5,17	0,20	2,77	0,20
<i>Ps</i>	2,09	5,19	7,26	18,79	12,33	8,51	5,16	0,07	2,41	0,16
<i>Fj</i>	2,53	6,40	6,02	18,47	11,59	8,87	5,17	0,09	2,91	0,22
<i>Ph</i>	4,93	10,28	6,00	20,69	9,80	8,01	6,65	0,13	1,75	0,16
<i>Cp</i>	3,71	9,02	6,17	21,40	8,99	9,61	7,62	0,27	2,78	0,05
<i>Pa</i>	5,75	9,65	7,23	19,41	7,77	8,65	6,30	0,23	2,48	0,13
<i>Pt</i>	5,40	9,71	6,35	21,49	8,18	7,38	6,30	0,21	2,30	0,19
<i>Ec</i>	6,12	12,60	7,62	20,54	5,71	6,77	4,82	0,20	1,78	0,08
<i>Tm</i>	4,12	6,04	8,79	23,63	10,16	8,79	2,75	0,00	0,55	0,00
	Gln	Cys	Met	Phe	Tyr	Trp	Lys	Arg	His	Pro
<i>Pin</i>	0,91	5,70	6,85	7,59	1,25	0,51	7,70	2,11	0,51	1,25
<i>Vc</i>	1,13	5,88	7,96	3,45	1,01	0,95	6,48	2,73	0,83	1,84
<i>Pir</i>	0,91	7,06	6,51	10,61	2,15	0,13	9,17	1,27	0,62	0,78
<i>Ps</i>	0,71	6,19	6,69	10,96	2,25	0,00	8,71	1,80	0,34	0,39
<i>Fj</i>	1,06	6,12	6,78	9,80	2,13	0,18	9,13	1,32	0,52	0,70
<i>Ph</i>	1,23	6,45	6,29	5,55	1,39	0,26	6,33	1,95	0,75	1,39
<i>Co</i>	1,03	6,00	6,24	5,18	1,28	0,32	6,86	1,47	0,57	1,45
<i>Pa</i>	1,21	6,12	7,30	5,19	1,47	0,49	5,96	1,96	1,03	1,68
<i>Pt</i>	1,16	6,67	6,93	5,50	0,93	0,61	6,48	2,06	0,95	1,19
<i>Ec</i>	0,93	6,40	8,23	4,29	1,01	0,69	6,20	3,48	0,45	2,07
<i>Tm</i>	0,00	4,95	7,69	8,79	1,10	1,10	7,69	2,47	0,27	1,10

Psychrophile Bakterien tendieren zu einer stärkeren Verwendung von Ile und reduzieren dafür nicht eine andere spezifische Aminosäure, sondern gleichen das durch die Menge der anderen Aminosäure aus. Die Aminosäurekomposition von *T. maritima* weicht stark von derjenigen der Mesophilen ab.

## VII.1.5 Extremophile exprimieren weniger sekretorische Proteine als ihr mesophiles Gegenstück

In diesem Abschnitt wurde die Anzahl an vorhergesagten sekretorischen Proteinen jedes Proteoms bestimmt um potentielle Unterschiede im Sekretom psychrophiler und mesophiler Eubakteria zu ermitteln. Dazu wurden die zuvor erwähnten Algorithmen benutzt und zusätzlich die Tat-Signalpeptide einbezogen. Zur Vorhersage von Tat-Signalpeptiden wurde auf die beiden Algorithmen Tatfind und TatP 1.0 zurückgegriffen (Bendtsen *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2002; Dilks *et al.*, 2005).

Tabelle 9: Anzahl an Proteinen, die durch SignalP 3.0 (klassische Signalpeptide), Tatfind, TatP 1.0 (beide Tat-Signalpeptide) und LipoP 1.0 (Lipoproteinsignalpeptide) vorhergesagt wurden. Zur besseren Übersicht wurde die durchschnittliche Anzahl der Proteine auf je eintausend Proteine relativiert. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien, #= Anzahl).

Organismus	# Proteine	SignalP	TatP	Tatfind	LipoP	# sekret. Proteine
<i>P. ingrahamii</i>	3545	55,85	7,05	1,13	23,97	88,00
<i>V. cholerae</i>	3934	58,97	14,23	2,29	39,40	114,89
<i>P. irgensii</i>	2557	24,64	3,13	1,56	62,18	91,51
<i>P. spec.</i>	2611	50,56	3,45	1,91	52,09	108,01
<i>F. johnsoniae</i>	5017	70,76	2,99	2,99	83,72	160,46
<i>P. haloplanktis</i>	3486	75,16	5,45	1,72	22,95	105,28
<i>C. psychr.</i>	4910	70,88	8,15	2,85	39,71	121,59
<i>P. atlantica</i>	4281	85,26	11,68	5,37	42,98	145,29
<i>P. tunicata</i>	4504	72,87	5,55	1,11	41,96	121,49
<i>E. coli</i>	4227	75,70	23,66	7,10	28,63	135,09
<i>T. maritima</i>	1858	11,30	6,46	1,61	9,69	29,06

Eine Analyse mit beiden Algorithmen war notwendig um die geringe Anzahl der Vorhersagen in einigen Organismen zu bestätigen. Die Untersuchung zeigt, dass die Anzahl der vorhergesagten Proteine in extremophilen Bakterien verringert ist im Vergleich zu ihrem jeweiligen mesophilen Gegenstück (außer *P. haloplanktis*; Tabelle 9). Für *T. maritima*, wo gerade einmal 21 klassische Signalpeptide (im Gegensatz zu 320 Signalpeptide in *E. coli*) identifiziert werden konnten, ist ein starker Unterschied erkennbar. Die nah verwandten Bakterien der CFB-Gruppe, nämlich *F. johnsoniae*, *P. spec* MED152 und *P. irgensii*, unterscheiden sich auch

stark in der Anzahl der vorhergesagten Proteine mit klassischen Signalpeptiden (Tabelle 9).

Dies reflektiert möglicherweise einen generellen Trend für Extremophile der CFB-Gruppe und in geringerem Ausmaß für die anderen Extremophilen. Die sehr geringe Anzahl vorhergesagter sekretorischer Proteine in *T. maritima* könnte entweder das Resultat starker struktureller Unterschiede zwischen mesophilen und thermophilen Signalpeptiden sein oder ein Resultat der denaturierenden Bedingungen des extrazellulären Raums.

### **VII.1.6 Untersuchungen zu den Transmembrandomänen psychrophiler Eubakteria.**

Die TMDs von Membranproteinen befinden sich in der Lipiddoppelschicht in engem Kontakt zu den Membranlipiden (van Meer *et al.*, 2008). Aus diesem Grund stellt sich die Frage inwieweit die Zusammensetzung der Lipidmembran mit der AS-Komposition und Länge der Transmembrandomänen koevolvierte. In Eukaryonten gibt es Hinweise dafür, dabei besitzen Proteine in der Plasmamembran, TMDs mit längeren hydrophoben Domänen, als Proteine im ER, das eine andere Lipidzusammensetzung besitzt (van Meer *et al.*, 2008).

Die Zusammensetzung der Lipidmembran kälteadaptierter Organismen unterscheidet sich von derjenigen mesophiler Organismen durch einen höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (Römisch und Matheson, 2003). In diesem Kapitel soll die Frage geklärt werden, ob die TMDs psychrophiler Organismen diese Unterschiede reflektieren in ihrer unmittelbaren Membranumgebung reflektieren und ob die TMDs sich von denjenigen mesophiler Organismen unterscheiden.

Tabelle 10: Aminosäurezusammensetzung der Transmembrandomänen. TMDs wurden durch HMMTOP vorhergesagt und die durchschnittlichen, relativen Vorkommen der zwanzig natürlichen Aminosäuren berechnet. Angaben in Prozent [%]. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*.

Org.	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Ser	Thr	Asp	Asn	Glu
<i>Pin</i>	8,11	12,52	9,71	18,00	12,51	7,76	5,52	0,97	1,92	0,65
<i>Vc</i>	8,60	13,89	10,70	18,59	10,43	7,14	5,27	0,86	1,60	0,60
<i>Pir</i>	8,01	9,14	9,09	16,53	14,79	6,71	5,30	0,97	2,73	0,84
<i>Ps</i>	7,50	8,65	8,90	17,21	15,23	7,37	5,48	0,87	2,44	0,74
<i>Fj</i>	7,12	9,60	8,57	17,11	14,48	7,55	5,45	0,74	2,47	0,64
<i>Ph</i>	7,83	13,43	10,31	18,06	12,30	7,60	5,32	0,75	1,88	0,54
<i>Cp.</i>	6,95	11,91	9,98	18,39	12,78	8,35	5,85	0,76	1,97	0,53
<i>Pa</i>	8,48	13,83	10,74	18,05	11,06	7,71	5,18	0,75	1,68	0,56
<i>Pt</i>	7,41	12,72	9,95	18,76	11,61	7,67	5,15	0,75	1,88	0,54
<i>Ec</i>	9,37	15,01	10,82	17,93	10,42	6,20	5,18	0,87	1,72	0,58
<i>Tm</i>	8,64	9,37	12,88	16,86	11,52	7,18	4,94	1,44	1,97	1,16
	Gln	Cys	Met	Phe	Tyr	Trp	Lys	Arg	His	Pro
<i>Pin</i>	0,89	1,50	3,06	8,14	2,77	1,50	0,85	0,44	0,55	2,62
<i>Vc</i>	0,96	1,44	3,57	7,23	2,57	1,94	0,76	0,44	0,61	2,89
<i>Pir</i>	1,17	1,41	2,68	11,04	3,56	1,15	1,52	0,51	0,57	2,28
<i>Ps</i>	1,39	1,39	2,38	11,59	3,64	1,02	1,42	0,39	0,47	1,92
<i>Fj</i>	1,54	1,71	2,53	11,55	3,59	1,03	1,43	0,40	0,50	1,99
<i>Ph</i>	0,94	1,75	2,86	7,99	2,79	1,45	0,85	0,38	0,60	2,38
<i>Cp</i>	0,91	1,59	3,13	8,24	3,00	1,32	0,93	0,43	0,60	2,38
<i>Pa</i>	0,91	1,86	3,36	7,46	2,47	1,60	0,78	0,44	0,58	2,50
<i>Pt</i>	1,03	1,87	2,99	8,63	2,82	1,50	0,97	0,38	0,62	2,42
<i>Ec</i>	0,91	1,71	3,79	6,61	2,37	1,99	0,60	0,52	0,58	2,88
<i>Tm</i>	0,78	0,94	2,99	9,83	3,17	1,15	1,15	0,61	0,57	2,86

Im ersten Schritt wurden Proteine mit HMMTOP vorhergesagt, die AS-Komposition der TMDs mit Perl Skripten bestimmt und die Anteile der Aminosäuren in den Transmembrandomänen der Prokaryoten analysiert. Auch hier erkennt man, dass die Frequenz von Ile in psychrophilen Prokaryonten (außer *P. irgensii* ein Vertreter der CFB-Gruppe) im Vergleich zu mesophilen Bakterien

höher ist (0,68-2,36%). Weiterhin ist der Anteil an Asn gleich bis erhöht (0,00-0,37%), die Daten für andere Aminosäuren zeigen keine Tendenz (Tabelle 10). Die Präferenz für Ile spiegelt sich auch in TMD wieder und ist nicht nur Eigenheit von Signalpeptiden.

Tabelle 11: Ladungsverteilung um die Transmembrandomänen und Länge der TMD. Vorhergesagte TMD-Proteine wurden auf die Ladungen 15 AS vor und nach der TMD untersucht. Arg/Lys gelten als positive Ladung und Glu/Asp als negative Ladung. Zusätzlich wurde die durchschnittliche Länge der transmembranen Domänen (TMD) und relative Anzahl transmembraner Proteine (TMP) am Gesamtproteom bestimmt. Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*.

Org.	# Proteine	TMP [%]	Nettoladung (In/Out)	Ladungsdifferenz (In/Out)	Länge der TMD [AS]
<i>Pin</i>	3545	39.44	1.58/-0.45	2.03	20.04
<i>Vc</i>	3934	37.39	1.57/-0.5	2.07	20.04
<i>Pir</i>	2557	38.54	2.08/-0.36	2.44	19.62
<i>Ps</i>	4237	25,63	1,70/-0,31	2,01	19.45
<i>Fj</i>	5017	42.41	1.74/-0.19	1.93	19.77
<i>Ph</i>	3486	37.79	1.82/-0.17	1.99	19.38
<i>Cp</i>	4910	39.88	1.54/-0.54	2.08	19.89
<i>Pa</i>	4281	40,99	1,20/-0,53	1,73	19,90
<i>Pt</i>	4504	38,49	1,21/-0,34	1,55	20,09
<i>Ec</i>	4227	40.09	1.72/-0.40	2.12	20.07
<i>Tm</i>	1858	38.71	1.53/-0.38	1.91	20.02

Für die TMD von *T. maritima* ist der Gehalt an Val (2,06-4,31%), Asp (0,57-0,7%), Glu (0,42-0,62%) erhöht und für Leu (0,25-1,9%), Glu (0,42-0,62%), Cys (0,45-0,93%) erniedrigt.

Weiterhin wurde die Ausprägung des Ladungsunterschieds um die erste TMD von TMD-Proteinen untersucht, da Veränderungen in der Stärke ionischer Wechselwirkungen diese beeinflussen könnten. Dazu wurden 15 AS um die Transmembrandomäne nach basischen (Arg, Lys) und sauren Aminosäuren (Asp, Glu) untersucht. Die Transmembrandomänen aus psychrophilen Bakterien

unterscheiden sich nicht in ihrer Länge und ihrer Ladungsverteilung um die erste Transmembrandomäne (Tabelle 11).

## VII.2 Die N-Acetylierung und Auswirkungen des Verlust auf Vitalität, Proteintranslokation und ERAD

### VII.2.1 Aufreinigung und N-Acetylierungen der Untereinheiten des Sec-Komplex

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Publikationen veröffentlicht, die zeigen, dass die N-Acetylierung nicht nur über die Stabilität eines Proteins entscheidet, sondern auch einen Beitrag zur Funktionalität eines Proteins leisten kann (Caesar und Blomberg 2004; Behnia, Panic *et al.*, 2004; Behnia, Barr *et al.*, 2007; Coulton, East *et al.*, 2010). Deshalb wurden die Untereinheiten des Sec-Komplexes auf N-Acetylierungen untersucht.

Die Untereinheiten des Sec-Komplexes wurden mit den web-basierten Algorithmen NetAcet 2.0 und TerminiNator 2.0 auf N-Acetylierungen analysiert (Frottin *et al.*, 2006; Kiemer *et al.*, 2005). Tabelle 12 zeigt, dass vier der sieben Untereinheiten (Sec61p, Sec71p, Sec62 und Sbh1p) N-acetyliert sind. Unterschiede zwischen den beiden Algorithmen zeigen sich im Fall von Sbh1p, welches in der Vorhersage von NetAcet 2.0 an der dritten Position und im Falle von Terminator 2.0 an der zweiten Position modifiziert ist (Tabelle 12). Die Vorhersagen unterstützen experimentelle Daten aus denen bekannt ist, dass Proteine mit -Met-Ser- am N-Terminus typische NatA-Substrate sind (Polevoda *et al.*, 2009).

Tabelle 12: bioinformatische Analyse der Untereinheiten des Sec-Komplexes auf N-Acetylierung. Die Sec-Untereinheiten wurden mit NatAcet 2.0 und TerminiNator 2.0 auf N-Acetylierungen untersucht. Die ersten zehn Aminosäuren der Untereinheiten und die Sicherheit der Vorhersagen sind in Score (NetAcet 2.0) bzw. in Prozent (Terminator 2.0) angegeben. Ein Score  $\geq 0,5$  gilt als signifikant (Frottin *et al.*, 2006; Kiemer *et al.*, 2005).

Protein	N-Terminus	NetAcet 2.0 [Score]	TerminiNator 2.0 [%]
Sec63p	MPTNYEYDEA	Nein [0,485]	P(2) [100%]
Sec61p	MSSNRVLDLF	Ac-S(2) [0,500]	Ac-S(2) [85%]
Sec71p	MSEFNETKFS	Ac-S(2) [0,512]	Ac-S(2) [85%]
Sec62p	MSAVGPGSNA	Ac-S(2) [0,506]	Ac-S(2) [85%]
Sss1p	MARASEKGEE	Nein [0,466]	A(2) [78%]
Sec72p	MVTLEYNANS	Nein [0,465]	V(2) [100%]
Sbh1p	MSSPTPPGGQ	Ac-S(3) [0,51]	Ac-S(2) [85%]

Anschließend wurden die Untereinheiten des heptameren Translokons aufgereinigt und massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 11). Dazu wurden die

Mikrosomen mit Digitonin solubilisiert, in der Ultrazentrifuge zentrifugiert um die RAMP-Fraktion zu entfernen, und der Überstand über eine Säule bestehend aus Anti-HA-Agarose aufgereinigt. Die HA-Agarose bindet Sss1p-Untereinheiten, da diese mit einem HA-Tag markiert sind (Soromani *et al.*, 2012). Nach der Elution und Fällung, wurden die aufgereinigten Proteine in einer denaturierenden SDS-PAGE untersucht und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 11). Danach wurden die Banden extrahiert, tryptisch verdaut und die Peptide massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 11).

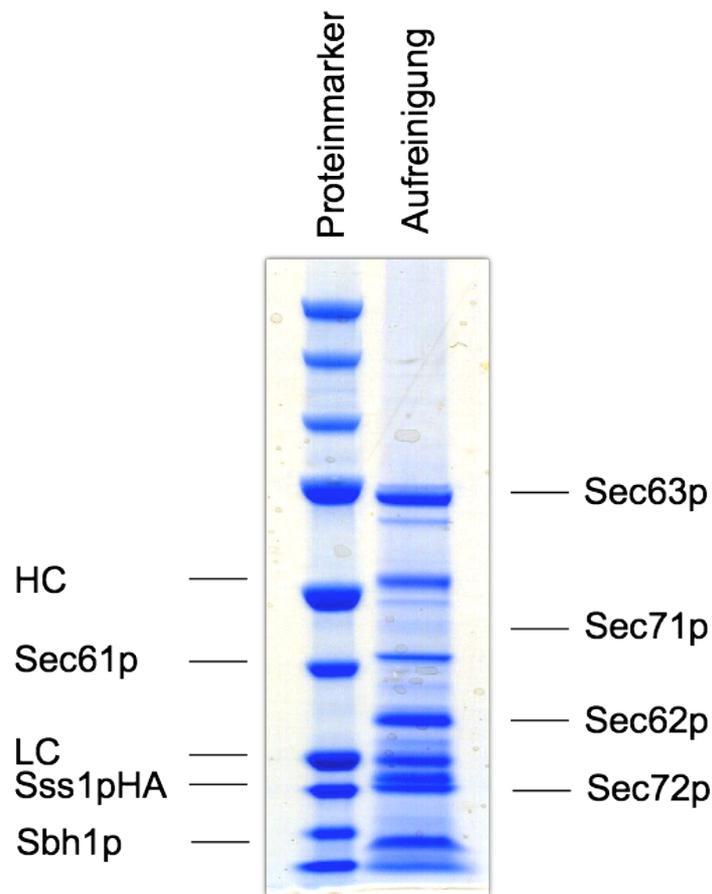


Abbildung 11: SDS-Page der aufgereinigten Untereinheiten des Sec-Komplexes. Die Untereinheiten wurden mit einer HA-Agarosesäule aufgereinigt, in einem 4-12% SDS-Gel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und Proteine identifiziert. Markerbanden von oben nach unten: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa und 10 kDa (Precision Plus Protein™ All Blue Standards von Biorad).

Ein Protein Score >110 und ein Ion Score >35 ist als signifikant anzusehen und belegt die N-Acetylierung für Sec62p und Sbh1p (Tabelle 13; Soromani *et al.*, 2012). Die Bestätigung einer N-Acetylierung für Sec61p gelang nicht, da der tryptische Verdau zu einem zu kurzen N-terminalen Peptid führte, welches in der MALDI-Analyse nicht erkannt wird. Die Identität der Sbh1p und der Sss1p

Untereinheiten waren aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt (Soromani *et al.*, 2012).

Tabelle 13: Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung. Die Sec-Untereinheiten wurden der Größe nach in einem 4-12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, ausgeschnitten und anschließend tryptisch verdaut. Für die identifizierten Proteine wurde der Protein Score, Ion Score und die Sequenz des erkannten N-terminalen Peptids angegeben. Proteine mit einem Protein Score >110 und einem Ion Score >35 gelten als signifikant in Bezug auf die N-Acetylierung (rot; Soromani *et al.*, 2012).

Protein	Größe [kDa]	Protein Score	Modifikation [Score]	N-terminales Peptid
Sec63p	70	131	---	MPTNYEYDEA
Sec61p	38	132	---	MSSNRVLDLF
Sec71p	31	175	---	MSEFNETKFS
Sec62p	28	122	Acetylierung [111]	Ac-MSAVGPGSNA
Sss1p-HA	22	59	---	MARASEKGEE
Sec72p	19	133	---	MVTLEYNANS
Sbh1p	12,5	61	Acetylierung [52]	Ac-MSSPTPPGGQ

Eine N-Acetylierung von Sec71p kann nicht bestätigt werden, da kein geeignetes Peptid in der MALDI-ToF-Analyse identifiziert werden konnte.

## VII.2.2 Effekte der NatA-Deletion auf Vitalität und Proteintranslokation in Hefen

50% der Proteine einer Hefezelle sind N-acetyliert, was sie zu der häufigsten Proteinmodifikation im Leben einer Zelle macht (Driessen *et al.*, 1985). Der Verlust der N-Acetylierung bei mehreren Untereinheiten des Translokationskomplexes könnte Auswirkungen auf dessen Funktionalität haben.

Da Sec62p und Sbh1p mit Sicherheit und Sec61p und Sec71p mit hoher Wahrscheinlichkeit durch NatA acetyliert werden, wurden Hefen des  $\Delta ard1$ -Stammes in einem Verdünnungsreihenexperiment („Droptest“) analysiert (Abbildung 12). Ard1p ist die katalytische Untereinheit des NatA Komplexes und essentiell für die Acetylierung spezifischer Substrate, die mit Met und Ser beginnen. Sec61p, Sec62p, Sec71p und Sbh1p sind demnach typische NatA-Substrate (Gautschi *et al.*, 2003).

Der  $\Delta doa10$ -Stamm, einer E3-Ub-Ligase, diente in diesem Experiment als weitere Kontrolle (Hwang *et al.*, 2010).

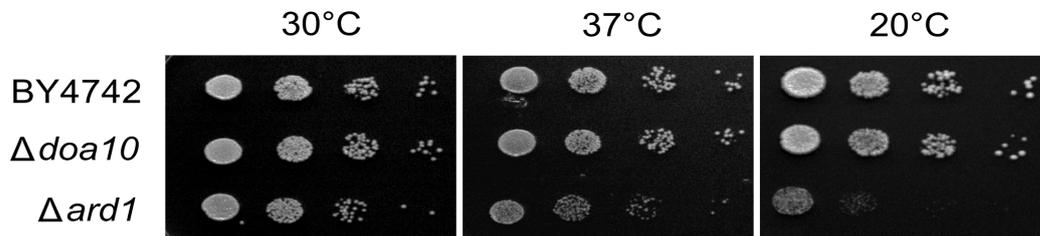


Abbildung 12: Untersuchungen zur Vitalität von Hefen bei einem Verlust von Ard1p und der N-Acetylierung durch NatA. Hefezellen (BY4742,  $\Delta doa10$ ,  $\Delta ard1$ ) wurden in einer Verdünnung von  $10^4$  bis  $10^1$ -Zellen auf YPD-Medium aufgetropft, bei den entsprechenden Temperaturen 3d inkubiert und das Wachstum dokumentiert.

Der Verlust der NatA-abhängigen N-Acetylierung führt zu einem leichten Wachstumsdefekt bei 37°C und einem schweren Wachstumsdefekt bei 20°C, ein verändertes Wachstumsverhalten bei 30°C, konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 12).

Um zu verifizieren, ob ein Verlust der N-Acetylierung von Sec62p, Sec61p, Sec71p und Sbh1p Auswirkungen auf die Translokation hat, wurde der  $\Delta ard1$ -Stamm mit Reporterkonstrukten transformiert, die mit der Uracil-Synthetase (URA3) fusioniert wurden (Ng *et al.*, 2007). Bei einer Beeinträchtigung der Translokation verbleibt das Fusionsprotein im Cytoplasma wo es seine Funktion aufnehmen kann und Uracil synthetisiert (Ng *et al.*, 2007). Die Lokalisation im Cytoplasma ist Voraussetzung für das Wachstum auf Uracil-Mangelmedium (Ng *et al.*, 2007). Um zwischen posttranslationaler und cotranslationaler Translokation zu unterscheiden, wurde URA3 entweder mit CPY (posttranslational importiert) oder PHO8 (cotranslational importiert) fusioniert und in Hefen transformiert (Ng *et al.*, 2007).

Weder der  $\Delta ard1$ -Stamm noch die wildtypischen Kontrolle (BY4742) zeigen Translokationsdefekte (Abbildung 13). Eine kürzlich isolierte Mutante mit starkem cotranslationalen Importdefekt (*sec61-302*) diente der Kontrolle des Systems (Abbildung 13, Ng *et al.*, 2007).

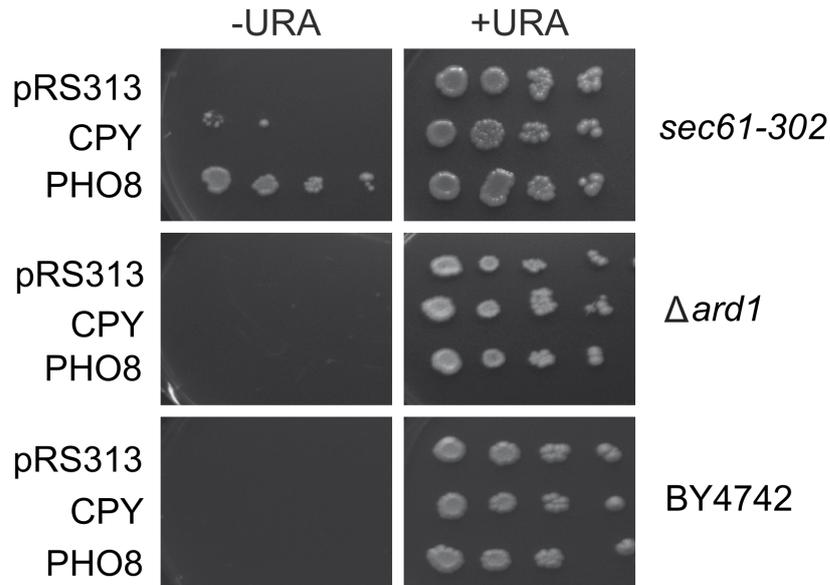


Abbildung 13: Auswirkungen der Ard1p-Defizienz auf die Translokation. Die Stämme  $\Delta ard1$  und BY4742 wurden mit Reporterkonstrukten für den post- bzw. cotranslationalen (CPY und PHO8) Import transformiert. Diese Reporterkonstrukte wurden mit URA3 fusioniert und synthetisieren Uracil, wenn durch einen fehlerhaften Import das Fusionskonstrukt im Cytoplasma verbleibt. Hefen mit einem Translokationsdefekt wachsen demzufolge auf Ura-d/o-Medium.

Pulse-Analysen bestätigen dieses Resultat und belegen, dass der Verlust der N-Acetylierung keinen Einfluss auf den Import von posttranslationalen Vorläuferproteinen ins ER-Lumen hat (Diplomarbeit Marie-Christine Klein).

### VII.2.3 Stabilität von Sec62p, Sec61p und Sbh1p bei Verlust der N-Acetylierung

Für die Stabilität eines Proteins ist die sog. N-End-Rule entscheidend (Varshawsky, 1997). Laut dieser Regel bestimmt die Aminosäure am äußersten N-Terminus über Stabilität oder Instabilität eines Proteins (Varshawsky, 1997). Alle Untereinheiten, die für eine N-Acetylierung in Frage kommen, beginnen mit einem initialen Methionin. MAPs legen das Serin frei, das lt. N-End-Rule zu den stabilisierenden Aminosäuren gehört (Varshawsky, 1997). Der Verlust der N-Acetylierung sollte also keinen destabilisierenden Effekt auf Sec61p, Sec62p und Sss1p haben.

Zur Bestätigung wurde ein CHX-Chase von bis zu 3 h im  $\Delta ard1$ -Stamm durchgeführt. Im Abstand von 45 min wurden Proben entnommen, Ganzzellextrakte angefertigt, und anschließend in einer SDS-Page mit Western-Blot analysiert (Abbildung 14).

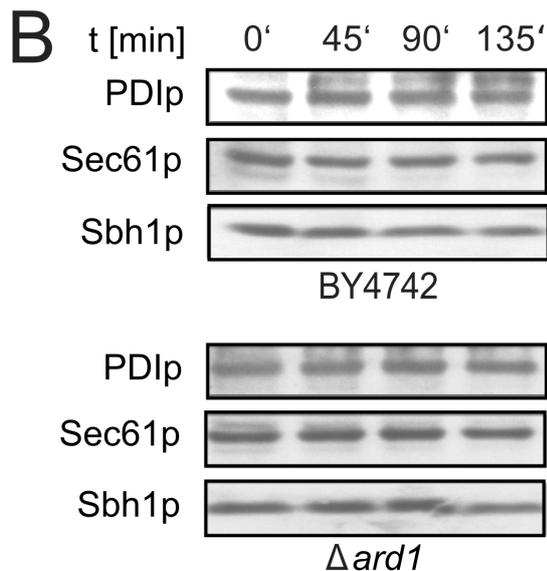
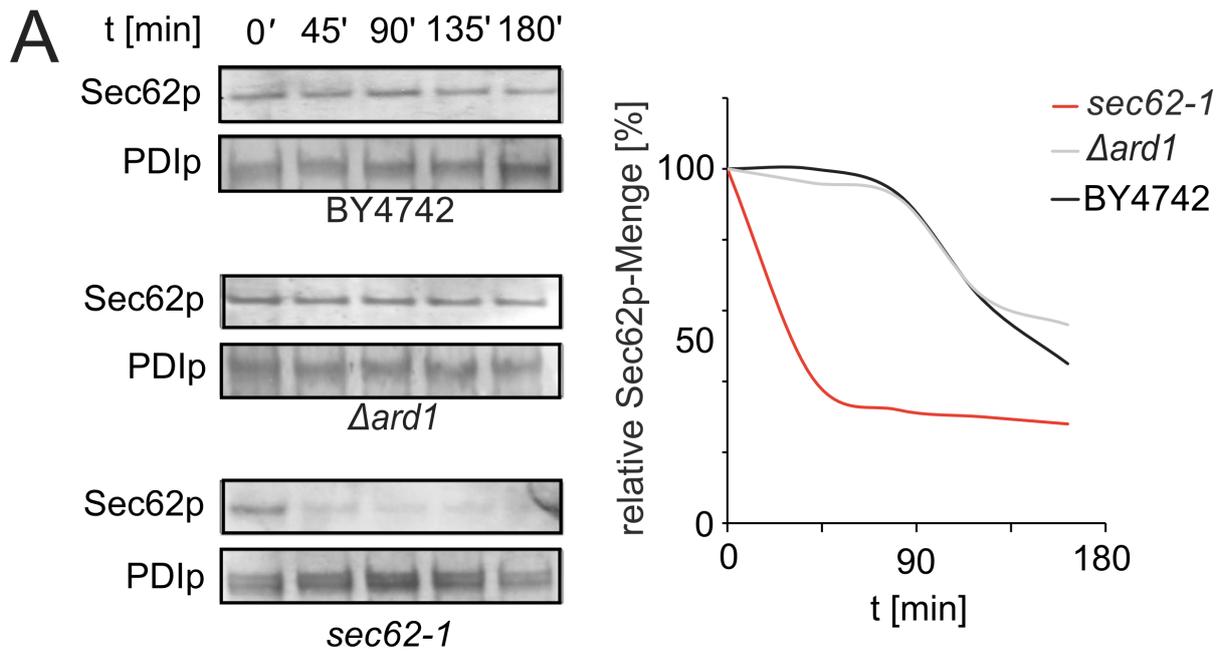


Abbildung 14: Untersuchungen zur Stabilität von Sec61p, Sbh1p und Sec62p bei Verlust der N-Acetylierung. **A** Ganzzelextrakte wurden im Western-Blot auf Stabilität von Sec62p untersucht (links) und grafisch ausgewertet (rechts). Als Kontrolle wurde die instabile Mutanten *sec62-1* benutzt. **B** Ganzzelextrakte wurden in einem Western Blot analysiert und gegen Sec61p und Sbh1p gefärbt. Dazu wurden gleiche Mengen Protein aufgetragen und PDlp zusätzlich als Ladekontrolle benutzt.

Die untersuchten Untereinheiten (Sec61p, Sec62 und Sbh1p) zeigen keine Stabilitätsunterschiede über einen Zeitraum von 3 h (Abbildung 14). Die *sec62-1*-Mutante (*sec62G41D*) ist im CHX-Chase instabil (Abbildung 14) und wird in 20 min auf 50% des ursprünglichen Sec62p-Gehalts degradiert (Abbildung 14). Sec61p, Sec62p und Sbh1p sind stabil beim Verlust der N-Acetylierung.

#### VII.2.4 Verlust der N-Acetylierung von Sec61p und dessen Auswirkung auf Proteintranslokation und ERAD

Die N-Acetylierung von Sec61p ist laut Vorhersagen und Literatur sehr wahrscheinlich, deshalb wurden erste Bemühungen unternommen einen möglichen Effekt eines Verlustes der N-Acetylierung zu untersuchen (Polevoda und Sherman, 2000, Polevoda *et al.*, 2009). Dazu wurde Serin an Position 2 zu Tyrosin mutiert (*sec61S2Y*), so dass der N-Terminus kein Substrat der drei N-Acetyltransferasen mehr ist und nicht mehr modifiziert wird (Polevoda und Sherman, 2000, Polevoda *et al.*, 2009).

Zur Bestimmung eines möglichen Translokationsdefekts in *sec61S2Y* wurde die Akkumulation des  $\alpha$ -Vorläuferproteins bestimmt. Dazu wurden die Hefen für 3 h bei der gewünschte Temperatur inkubiert, Ganzzellextrakte angefertigt und gleiche Mengen Protein in einer SDS-PAGE analysiert. Die Mutation *sec61S2Y* führt zu einer geringfügigen Akkumulation des PpaF bei 30°C, aber nicht bei 20°C und 37°C (Abbildung 15). Damit spielt der N-Terminus von Sec61p eine Rolle im posttranslationalen Import des PpaF.

Die *sec61S2Y*-Mutante ist temperatursensitiv bei 37°C, zeigt aber keine Ausfälle bei 30°C und 20°C (Abbildung 15 B links). Die Hitzesensitivität entspricht nicht der beobachteten Kältesensitivität bei einem globalen Ausfall der NatA-Acetylierung (Vgl. Abbildung 12). Der *sec61S2Y*-Stamm ist schon bei geringen Tunikamycin Konzentrationen sensitiv, was auf eine Induktion der UPR hindeutet (Abbildung 15 B rechts).

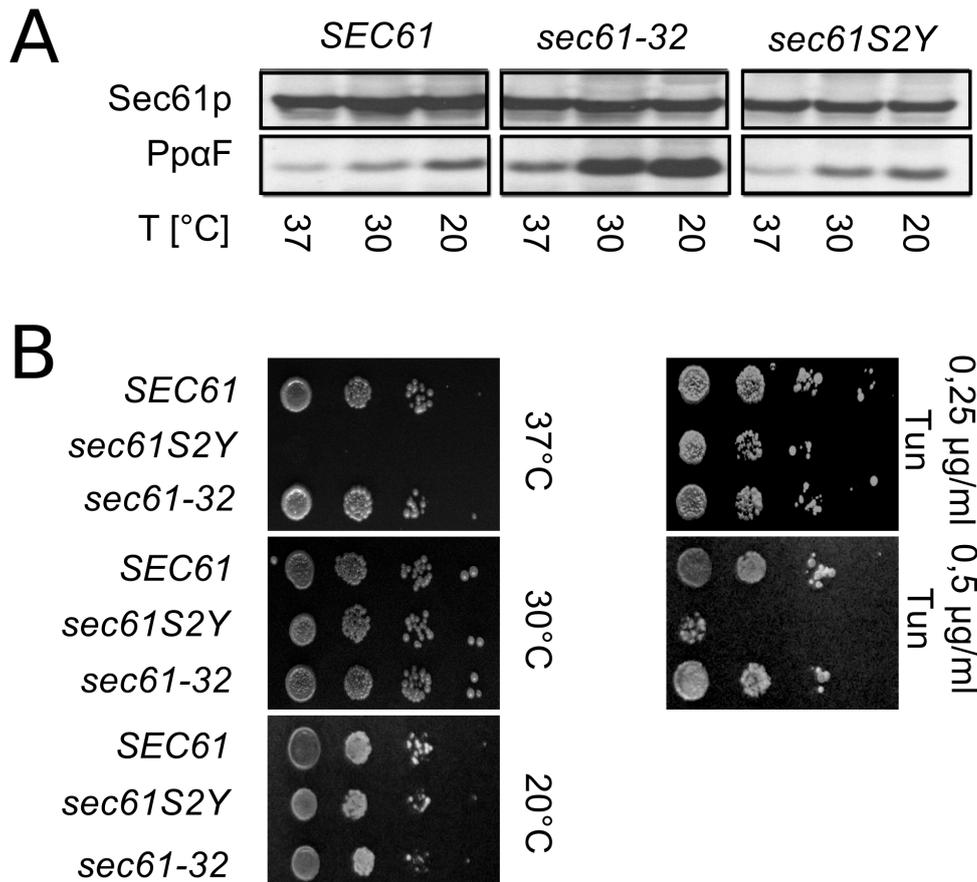


Abbildung 15: Vorläuferakkumulation und Wachstumsinhibition in *sec61S2Y*-Hefen. **A** gleiche Mengen Protein wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf PpaF-Akkumulation untersucht um eine Störung des Import nachzuweisen. **B** Droptest zur Überprüfung möglicher Effekte der Mutation auf die Vitalität bei verschiedenen Temperaturen und unter Einfluss von des UPR-Induktors Tunikamycin.

Tunikamycin hemmt die GlcNAc-1-P-Transferase und den Transfer von GlcNAc-1-P aus UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat, an das dann die weiteren Zucker des Oligosaccharides geknüpft werden (Merli *et al.*, 1982; Elbein 1984). Die Akkumulation nicht glykosylierter Proteine im ER-Lumen führt zur Aktivierung der UPR.

### VII.2.5 CPY\*-Degradation in *sec61S2Y*-Hefen

Durch die Mutation G255R von CPY (CPY\*) faltet dieses inkorrekt und wird durch ERAD degradiert (Finger *et al.*, 1993, Hiller *et al.*, 1996).

Um zu untersuchen, wie sich die S2Y-Mutation auf die CPY\*-Degradation auswirkt, wurde die Translation von *sec61S2Y*-Hefen durch Zugabe von CHX zum Zeitpunkt  $t=0$  inhibiert und anschließend im Abstand von 20 min Proben entnommen. Diese Zellen wurden aufgeschlossen, die Proteine in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und im Western-Blot gegen CPY\* und Sec61p gefärbt. Im

*SEC61*-Stamm beträgt die CPY\*-Menge nach 20 min 70% (45% in *SEC61*) und nach 40 min 50% (25% in *SEC61*) der ursprünglichen CPY\*-Menge (Abbildung 16 A).

In Pulse-Chase-Analysen wurden Proteine durch die Zugabe von <sup>35</sup>S-Met/Cys markiert, alle 20 min Proben entnommen und anschließend Ganzzellextrakte angefertigt. Dann wurde CPY\* mit spezifischen Antikörpern gefällt und die Präzipitation in einer SDS-PAGE analysiert. Die CPY\*-Degradation verläuft langsamer als in der wildtypischen Kontrolle (Abbildung 16 B). Nach 20 min beträgt die verbleibende CPY\*-Menge in *sec61S2Y* noch 70% (48% in *SEC61*) und nach 40 min 46% (25% in *SEC61*; Abbildung 16 B).

Hefen des *sec61S2Y*-Stammes sind beeinträchtigt in ihrer Fähigkeit CPY\* zu degradieren. Die Halbwertszeit für CPY\* in der *sec61S2Y*-Mutanten liegt bei ca. 40 min und ist damit doppelt so hoch, wie in *SEC61*-Hefen (Abbildung 16).

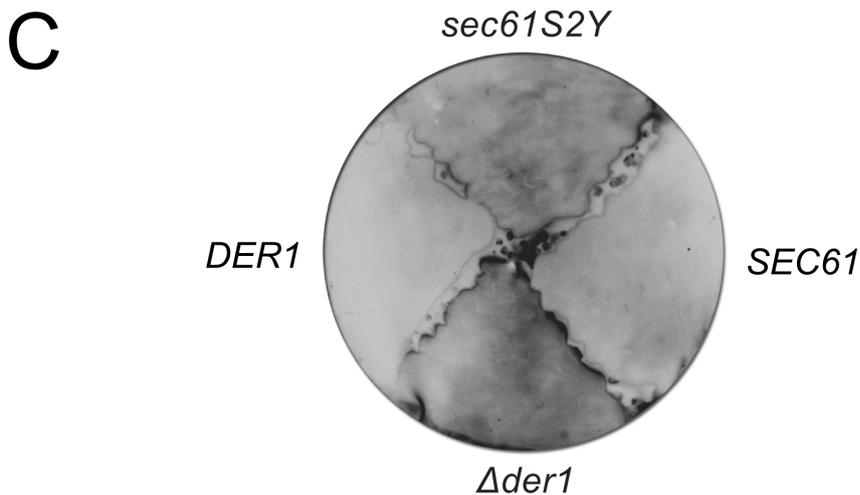
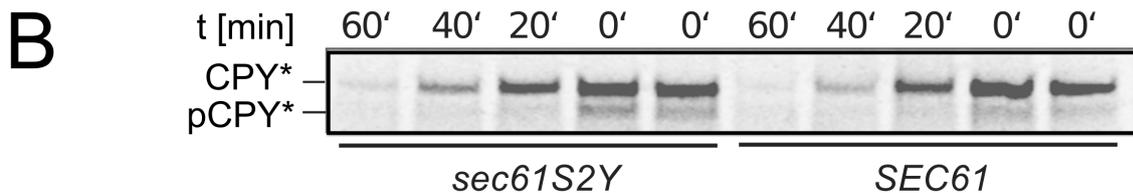
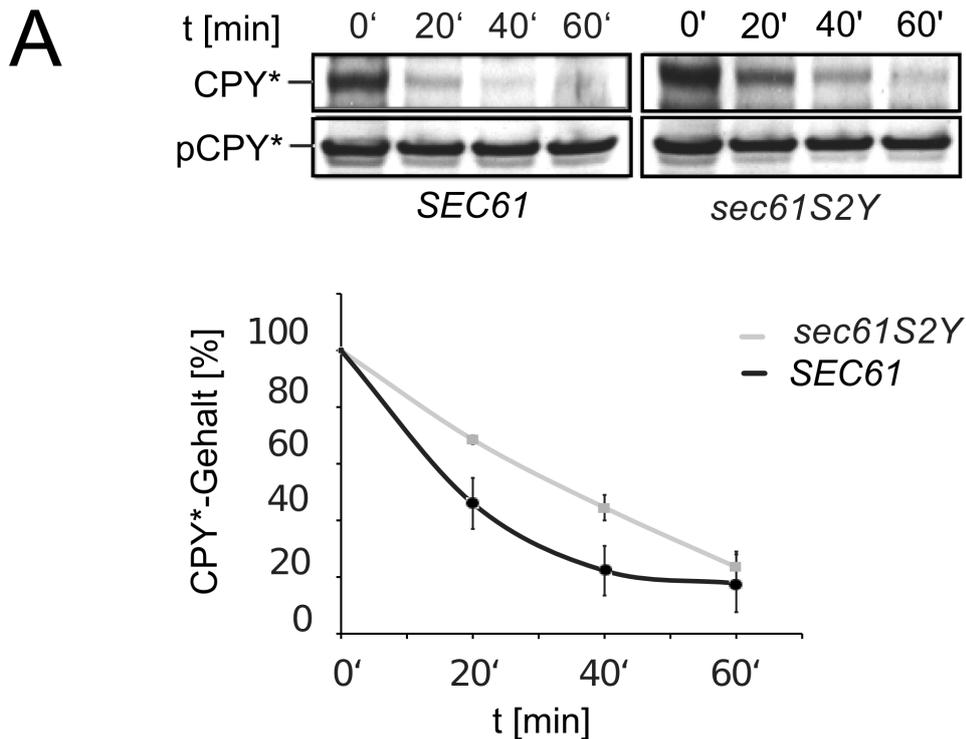


Abbildung 16: Untersuchungen des *sec61S2Y*-Stammes auf ERAD-Defekte. **A** *sec61S2Y*-Hefen wurden mit CHX behandelt um die Translation zu inhibieren. Anschließend wurden quantitative vergleichbare Mengen geerntet und die Hefen lysiert. Dann wurde CPY\* mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen (oben) und die relativen Mengen grafisch dargestellt (unten) **B** Hefen wurden mit radioaktivem Met/Cys markiert, geerntet, lysiert und CPY\* spezifisch gefällt. Der CPY\*-Gehalt wurde anschließend in einer denaturierenden SDS-PAGE bestimmt. **C** Colony-Blot zum Nachweis des CPY\*-Gehalt nach 10-stündiger Inkubation auf YPD-Platten mit CHX. Nach der Lyse wurde CPY\* mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. pCPY\*= cytoplasmatisches CPY\*, CPY\*= ER-residentes CPY\*

Zur Bestätigung der CHX-Analyse wurde ein Colony-Blot durchgeführt. Die Stämme *sec61S2Y* und *SEC61* wurden auf Nitrocellulose ausgestrichen und für 2 d auf YPD inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht auf eine KAc-Platte transferiert, um die CPY\*-Expression zu erhöhen, und anschließend für 10 h auf CHX-Platten, um die Translation zu inhibieren (Knop *et al.*, 1996). Die Zellen wurden anschließend lysiert, Zelldebris abgespült und die Membran mit Antikörpern gegen CPY\* gefärbt um den Gehalt an CPY\* zu bestimmen. Der Colony-Blot bestätigt den Eindruck des CHX-Chase, denn auch hier befindet sich zum Zeitpunkt der Lyse mehr CPY\* in *sec61S2Y* als in *SEC61* (Abbildung 16 C).

Zur Kontrolle des Systems wurde ein Der1p-Deletionsstamm ( $\Delta$ *der1*) und sein Wildtyp (*DER1*) untersucht. Der Verlust von Der1p führt zu Degradationsdefekten von CPY\* durch ERAD (Knop *et al.*, 1996).

## **VII.3 Rationales Design bekannter Mutanten und deren Effekte auf ERAD**

### **VII.3.1 Alignment von Sec61-Homologen zur Identifikation Punktmutationen**

Sec61p aus Hefe wurde mit dem humane Sec61 $\alpha$  und dem bakterielle SecY verglichen und homologe Bereiche identifiziert (Abbildung 17). Homologe Mutationen, die aus den zuvor erwähnten Organismen bekannt waren, wurden mutiert und die Auswirkungen der Mutationen auf Import, ERAD und Vitalität beobachtet: Die Mutation *sec61P50S* wurde ursprünglich in SecY aus *E. coli* (*secYP40S*) identifiziert. Sie liegt im N-terminalen Bereich des Hefe-Sec61p. Die Mutationen *sec61F311Y* (*secYF286Y* aus *E. coli*) und *sec61Y345H* (*sec61Y344H* aus *Homo sapiens* und *Mus musculus*) sind in Loop 7 lokalisiert (de Keyzer *et al.*, 2002; Lloyd *et al.*, 2010). Dieser Loop reicht ins ER-Lumen und ist u.a. bekannt für die Mutation *sec61-3* (G341D). Die Mutation *sec61M450N* liegt im kontraktilen Ring und ist eine Variante der schon länger bekannten Mutation *secYI408N* aus *E. coli* und *sec61M450K* aus *S. cerevisiae* (Junne *et al.*, 2007; de Keyzer *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005).



Insulinvorläufern im ER-Lumen durch Exportdefekte könnte sich möglicherweise cytotoxisch auf die Zelle auswirken. Zunächst wurde die Auswirkung der Mutation auf die Vitalität und Tunikamycinsensitivität bestimmt (Abbildung 18). Dazu wurde eine abnehmende Verdünnungsreihe der Stämme *sec61Y345H*, *SEC61* und *sec61-32* auf YPD-Platten getropft und das Wachstum nach 3 d bei 37°C bzw. 30°C und nach 8 d bei 17°C und bei Zugabe von 0,25 und 0,5 µg/ml Tunikamycin dokumentiert. Der Stamm *sec61Y345H* zeigt kein verändertes Wachstum bei 37°C und 30°C im Vergleich zu *SEC61*, aber eine leichte Kältesensitivität bei 17°C (Abbildung 18 oben links). Die Zugabe von Tunikamycin in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl, aber nicht von 0,25 µg/µl, führt zu Wachstumsbeeinträchtigungen im Vergleich zu YPD-Platten ohne Tunikamycin (Abbildung 18 oben rechts).

Hefen (*sec61Y345H*) wurden mit Reporterplasmiden (pJC30 und pJC31) transformiert, die für die β-Galaktosidase kodieren (Belden und Barlowe, 2001). Im Plasmid pJC31 ist dieses unter der Kontrolle eines UPR-Element (UPRE), dass auf die Induktion der UPR reagiert und die Expression der β-Galaktosidase erhöht (Belden und Barlowe, 2001). Durch die Zugabe von ONPG wird eine Farbreaktion induziert, die anschließend colorimetrisch im Photometer nachgewiesen werden kann (Belden und Barlowe, 2001). Der UPRE-Flüssigassay zeigt eine moderate UPR-Aktivität von *sec61Y345H* (Vgl. pJC30 und pJC31 Abbildung 18 unten).

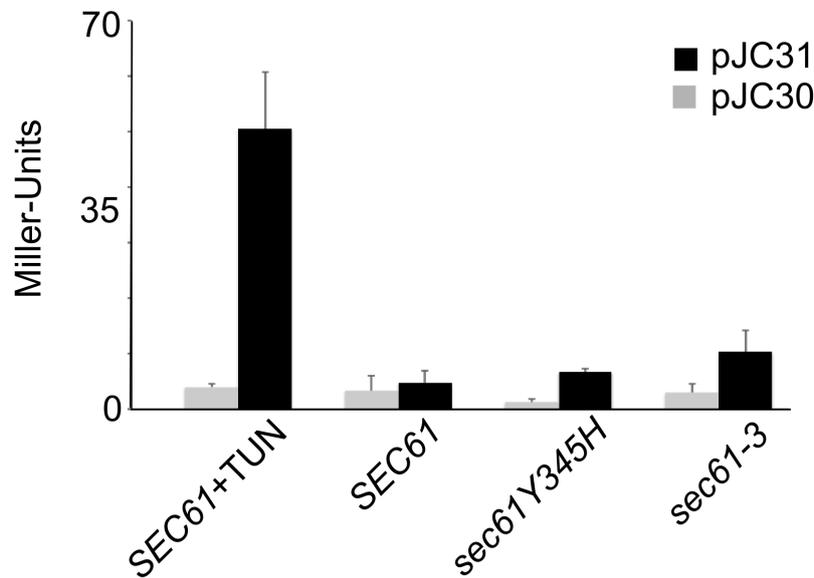
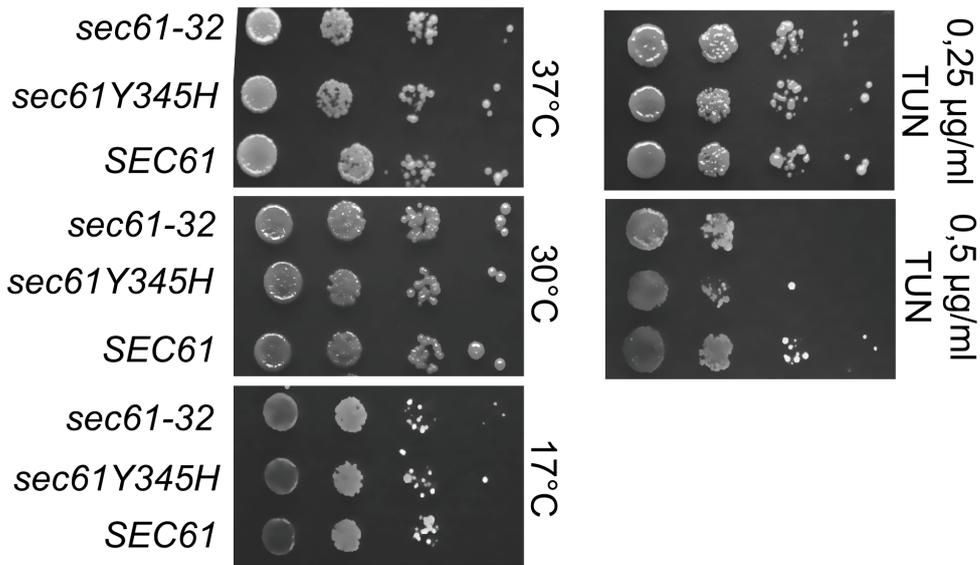


Abbildung 18: Vitalität und Tunikamycin-Sensitivität im Stamm *sec61Y345H*. **A** Hefen mit der *sec61Y345H* Mutation wurden bei 37°C, 30°C, mit 0,25 oder 0,5 µg/µl Tunikamycin bzw. ohne Tunikamycin, und 17°C für 2 d, 3 d oder 7 d wachsen gelassen und anschließend dokumentiert. **B** Hefen (*SEC61*, *sec61Y345H*, *sec61-3*) wurden mit Reporterplasmiden (pJC31, pJC30) transformiert und auf die Expression von β-Galaktosidase untersucht. Im Falle von pJC31 ist β-Galaktosidase unter der Kontrolle eines UPR-Promotors, der bei induzierter UPR aktiviert wird.

Die Stabilität von CPY\* wurde anschließend im Pulse-Chase-Experiment überprüft. In drei unabhängigen Experimenten wurde CPY\* zum Zeitpunkt t=0 radioaktiv markiert und auf Degradation beobachtet. Es kann nur eine leichte Veränderung der CPY\*-Degradation beobachtet werden, die sich in einer

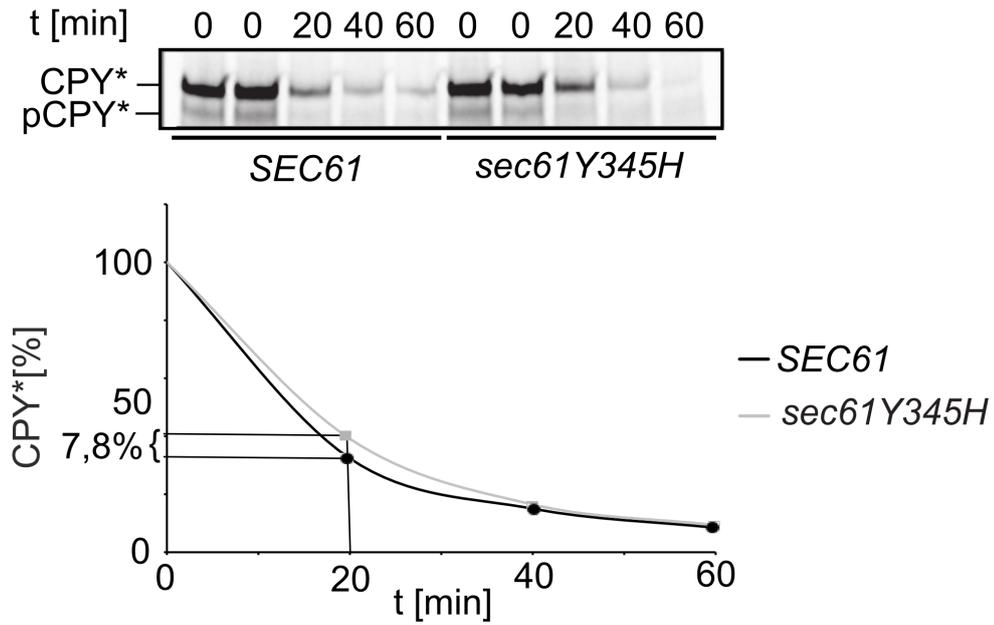
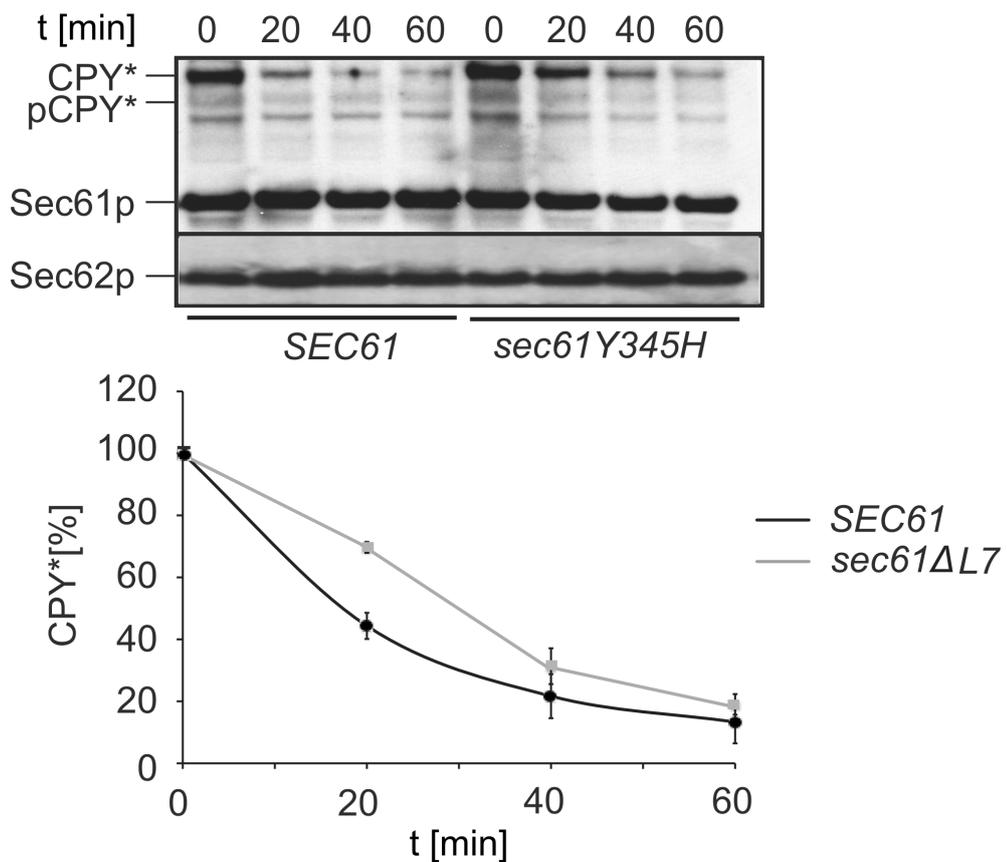
**A****B**

Abbildung 19: Analyse von CPY\*-Degradationsdefekten im Hefestamm *sec61Y345H*. **A** Pulse-Chase-Analyse von *sec61Y345H*. Das Diagramm fasst die Resultate dreier unabhängiger Experimente zusammen. Die Werte der drei Versuche unterschieden sich im Mittel zu 7% und einer Standardabweichung von 1,8% **B** CHX-Analyse von *sec61Y345H*. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimente. pCPY\*= cytoplasmatisches CPY\*, CPY\*= ER-residentes CPY\*.

Verlangsamung der Degradation zum Zeitpunkt  $t=20$  min und einem Unterschied von 7,8% ( $\sigma=1,8\%$ ) manifestiert (Abbildung 19 A). Nach 40 min bzw. 60 min sind keine Unterschiede mehr erkennbar (Abbildung 19 A).

Im CHX-Chase ergibt sich ein ähnliches Bild: *SEC61*-Hefen haben nach 20 min noch 46% der ursprünglichen CPY\*-Menge während *sec61Y345H*-Hefen noch 70% CPY\* enthalten. Der Unterschied von 24% relativiert sich zu den späteren Zeitpunkten. Im CHX-Chase zeigen Hefen mit der Mutation *sec61Y345H* CPY\*-Degradationsdefekte in der frühen Phase (Abbildung 19 B).

Die Arbeitsgruppe um Schäuble *et al.*, 2012 konnte zeigen, dass Loop 7 in Säugern zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beiträgt. Eine solche Funktion in *S. cerevisiae* wurde bisher noch nicht gezeigt. Die Auswirkungen der Mutation Y345H auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zelle, wurden durch einen Droptest in Anwesenheit von EGTA untersucht. EGTA ist ein Chelator zweiwertiger Kationen und entzieht der Zelle das notwendige  $\text{Ca}^{2+}$  (Gegenheimer 1990). Zur Kontrolle wurde der  $\Delta pmr1$ -Stamm verwendet, der durch die Deletion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe Pmr1p in seiner Fähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$  im ER zu speichern eingeschränkt ist und vermindertes Wachstum unter EGTA zeigt (Halachmi und Eilam 1996). Hefen mit der Punktmutation Y345H sind nicht sensitiv gegenüber EGTA und damit in der Lage die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase aufrechtzuerhalten (Abbildung 20).

Die Mutation *sec61Y345H* ist geringfügig kältesensitiv und sensitiv gegenüber Tunikamycin (Abbildung 18). Im Pulse-Chase und CHX-Chase ist eine Verringerung der CPY\*-Degradation erkennbar (Abbildung 19).

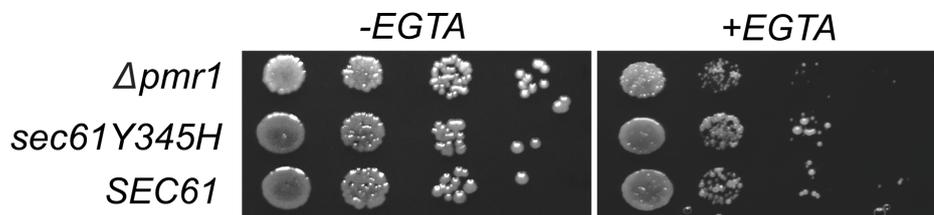


Abbildung 20: Hefen des Stamms *sec61Y345H* wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen auf eine YPD-Platte mit und ohne 5 mM EGTA getropft. Zellen mit Störungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht zwischen Cytosol und ER-Lumen zeichnen sich durch verringertes Wachstum aus. Zur Kontrolle wurde ein Pmr1p-Deletionsstamm benutzt ( $\Delta pmr1$ ). Pmr1p ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe.

### VII.3.3 Vitalität, Precursorakkumulation und Degradationsdefekte in *sec61P50S*- und *sec61F311Y*-Hefen

Während dieser Arbeit wurden noch zwei weitere Mutationen untersucht: *sec61F311Y* und *sec61P50S*. Die Mutation *sec61F311Y* ist eine weitere Mutation, die in Loop 7 lokalisiert ist. Die Mutation *sec61P50S* liegt am Ende der aufliegenden Helix des N-Terminus (Wilkinson *et al.*, 1997).

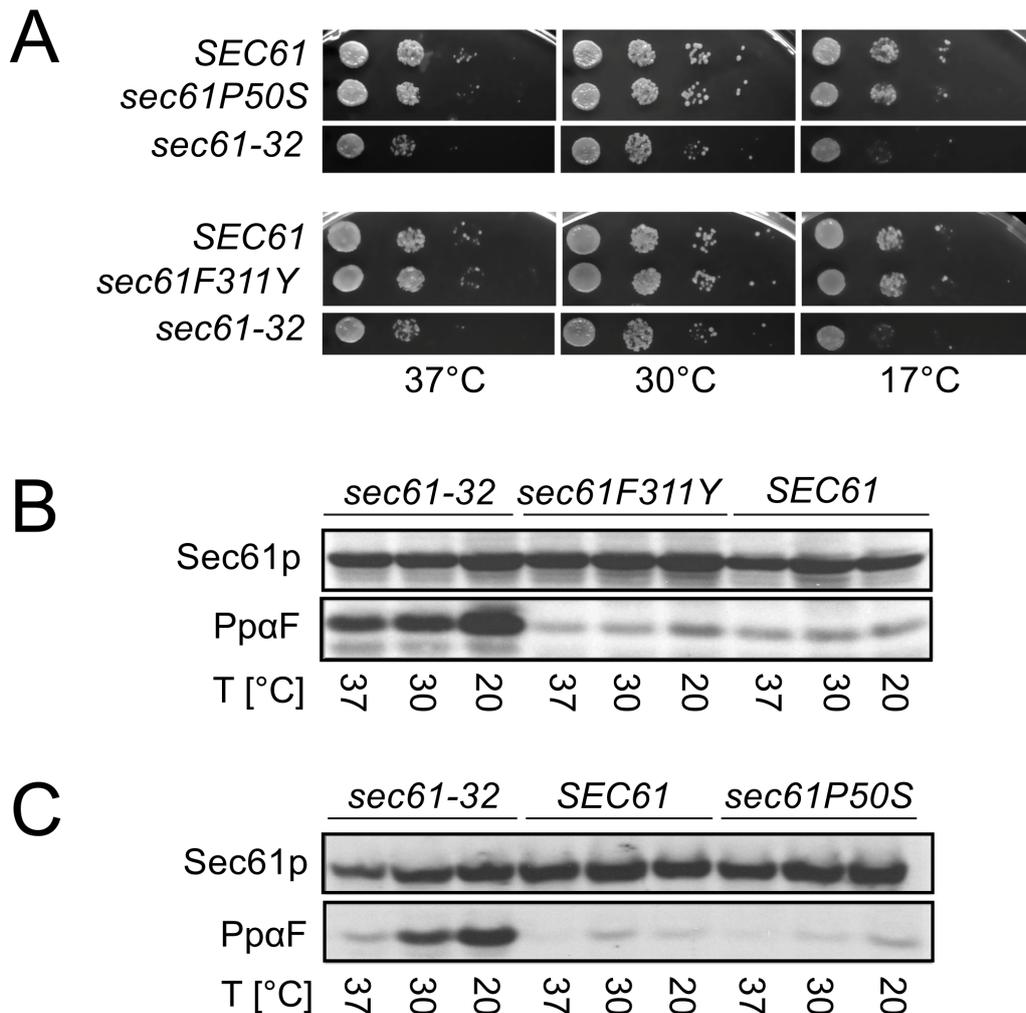


Abbildung 21: Untersuchungen im Droptest und zur Precursorakkumulation in *sec61F311Y* und *sec61P50S*. **A** Hefen der zuvor erwähnten Stämmen und *SEC61* bzw. *sec61-32*-Hefen wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen in tropfenform aufgetragen und für 60 h bei 37°C, 30°C und für 7 d bei 17°C wachsen lassen und anschließend dokumentiert. **B** Die  $OD_{600}$  von KRY461-*sec61F311Y* in der exponentiellen Phase wurden bestimmt und Ganzzellextrakte angefertigt. Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden in einer SDS-PAGE mit anschließenden Western Blot mit Antikörper gegen Sec61p und PpaF untersucht. **C** Durchführung wie B, aber mit KRY461-*sec61P50S*.

Beide Mutationen wurden in einer ortsgerichteten Mutagenese etabliert und Hefen auf Precursorakkumulation und Vitalität untersucht. Beide zeigen keine Temperatursensitivität und auch keine Akkumulation des  $\alpha$ F-Vorläufers (Abbildung

21). Weder die *sec61P50S* noch die Mutation *sec61F311Y* resultieren in einem veränderten Phänotyp (Abbildung 21). Beide Mutanten wurden anschließend im CHX-Chase auf Degradationsdefekte untersucht, dazu wurden alle 20 min Proben entnommen, aufgeschlossen und in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot analysiert. Beide Mutationen zeigen kein verändertes Verhalten in ihrer Degradationsgeschwindigkeit von CPY\* und sind somit nicht defekt bzgl. ERAD (Abbildung 22). Auf weitere Untersuchungen im Pulse-Chase wurde aufgrund der Daten aus dem CHX-Chase verzichtet.

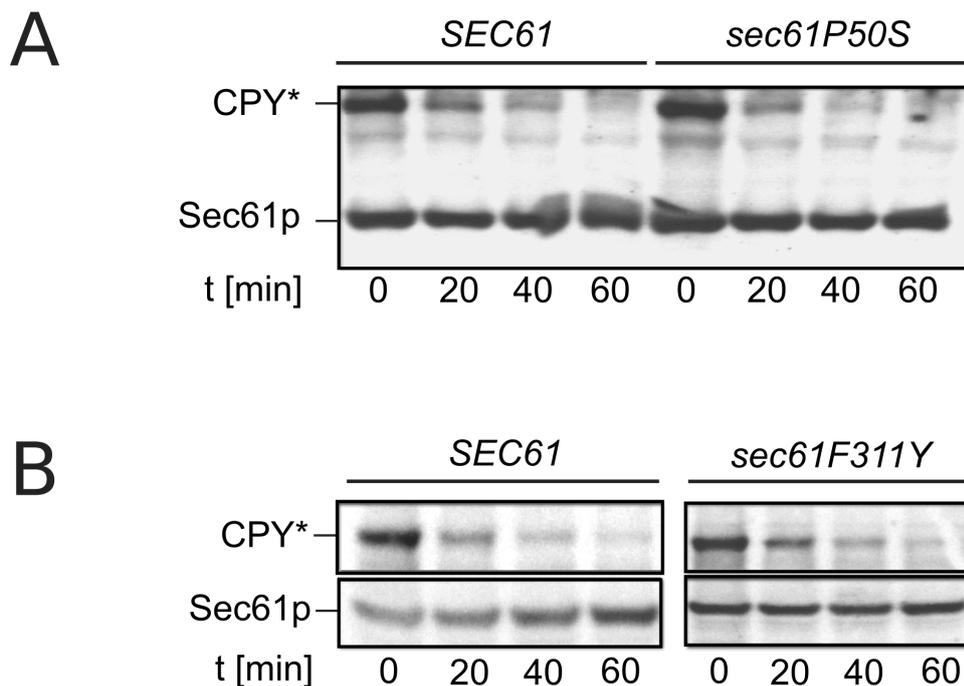


Abbildung 22: CHX-Chase zur Degradation von CPY\* in *sec61P50S* und *sec61F311Y*. Hefezellen der exponentiellen Phase wurden zum Zeitpunkt t=0 mit CHX behandelt und die Translation inhibiert. Im Abstand von 20 min wurden Extrakte angefertigt und CPY\* bzw. Sec61p im Western-Blot detektiert.

Hefen mit den Mutationen *sec61F311Y* und *sec61P50S* zeigen keine Defekte in der Translokation, ERAD oder im Wachstum bei verschiedenen Temperaturen (Abbildung 21 und Abbildung 22).

### VII.3.4 Die Mutation *sec61M450N*, Eine neue Variante einer altbekannten Mutation im hydrophoben Ring

Die homologe Hefemutation M450N zeigt leichte Wachstumsdefekt im Droptest bei 37°C und keine Precursorakkumulation bei den untersuchten Temperaturen (Abbildung 23 A und B).

Die Mutation *sec61M450K*, aus *S. cerevisiae*, wurde in einem Screen auf Defekte in der Signalpeptidbindung entdeckt und charakterisiert (Junne *et al.*, 2007). Sie liegt im sog. kontraktilen Ring von TMD10, einer hydrophoben Verengung im Translokationskanal, und ist in *in-vitro*-Experimenten translokationskompetent und zeigt geringe Wachstumsstörungen bei 15°C (Junne *et al.*, 2007).

Im CHX-Chase zeigt sie Degradationsdefekte über den gesamten beobachteten Zeitraum. Im Wildtyp liegt der CPY\*-Restgehalt nach 20 min bei 45% und nach 40 min bei 21%. In der Mutante hingegen liegt die CPY\*-Menge in *sec61M450N* nach 20 min bei 70% und nach 40 min bei 50%. Dieser Unterschied bleibt bis zum Ende der Beobachtungsperiode bestehen und liegt nach 60 min bei 12% für SEC61 und bei 37% für *sec61M450N*. CPY\* wird in *sec61M450N* stabilisiert und hat eine Halbwertszeit von  $t_{1/2}=40$  min (Abbildung 23 C).

Die Mutation im kontraktilen Ring zeigt keine Beeinträchtigung in der Translokation und im Wachstum, aber in der CPY\*-Degradation (Abbildung 23).

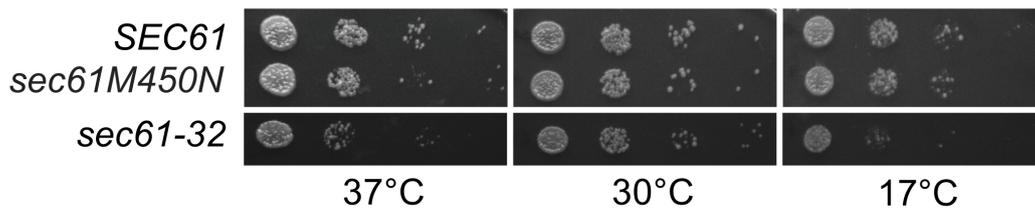
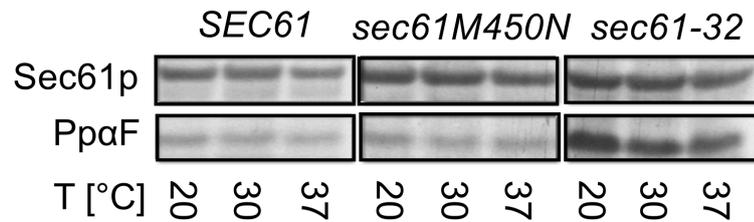
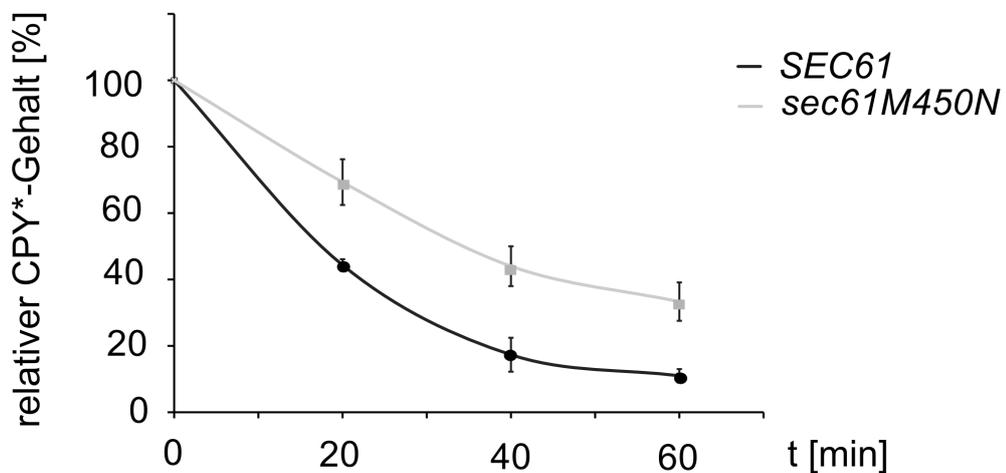
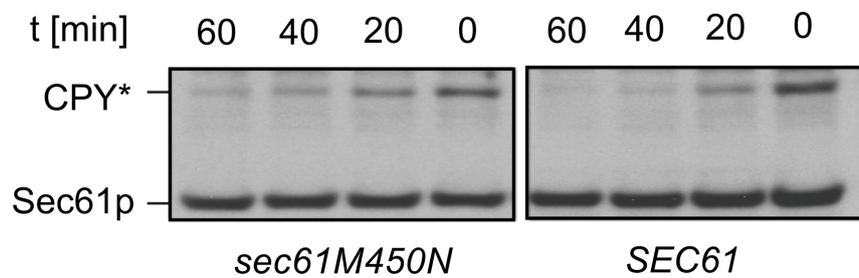
**A****B****C**

Abbildung 23: Untersuchungen von *sec61M450N*-Hefen zur Vitalität, Precursorakkumulation und CPY\*-Degradation im CHX-Chase. **A** Hefen (*sec61M450N*) und Kontrollen wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  auf YPD-Platten getropft und für 60 min bei 37°C, 30°C und für 7 d bei 17°C wachsen lassen. **B** Auswirkung der Punktmutation auf die Translokation im zuvor erwähnten Hefestamm. Der Nachweis der PpaF-Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur erfolgte mit spezifischen Antikörpern. **C** CHX-Chase mit Extrakten zum Zeitpunkt 0, 20, 40 und 60 min und Detektion von CPY\* im Western-Blot. Sec61p dient als Ladekontrolle.

## VII.4 Zufallsmutagenese in ausgewählten Bereichen von Sec61p

Sec61p ist ein 10-fach transmembranes Protein, dessen transmembraner Aminosäureanteil sehr hoch ist (Wilkinson *et al.*, 1997). Mutationen in Transmembrandomänen führen oft zur Störung des hydrophoben Charakters und zu strukturellen Veränderungen. Diese Art der Mutationen führen nicht zu neuen Erkenntnissen über die Funktion des Proteins. Erfolgsversprechender dagegen ist die gezielte aber zufällige Mutagenese der exponierten Loops bzw. Enden, die dem Cytosol oder dem ER-Lumen zugewandt sind. Dazu wurde eine Serie von Punktmutationen in den Sec61p-ORF mutiert, um neue Schnittstellen zu etablieren, ohne dabei die AS-Sequenz zu verändern (Tabelle 14). Die neuen Konstrukte ermöglichen es gezielt Loop 7 (*sec61L7*), Loop 8 (*sec61L8*), den N- (*sec61N*) oder den C-Terminus (*sec61C*) zu entfernen (Abbildung 24; Bachelorarbeit Annika Heckmanns).

Loop 7 ist bekannt für die *sec61-3*-Mutation, für seine Funktion in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase, darüberhinaus ist er ein Kandidat für die lumenale Interaktion mit BiP (Schäuble *et al.*, 2012). Loop 8 ist an der Bindung des Ribosoms an den Sec61-Kanal beteiligt (Cheng *et al.*, 2005). Der N-Terminus ist dem Cytosol zugewandt, seine  $\alpha$ -Helix liegt der Membran auf und beherbergt in Säugern ein IQ-Motif zur Calmodulin-Bindung (Wilkinson *et al.*, 1997; Erdmann *et al.*, 2011). Ein C-Terminus mit fusioniertem Tag führt zu Wachstums- und Translokationsdefekten, was für seine physiologische Rolle spricht (Carvalho *et al.*, 2006).

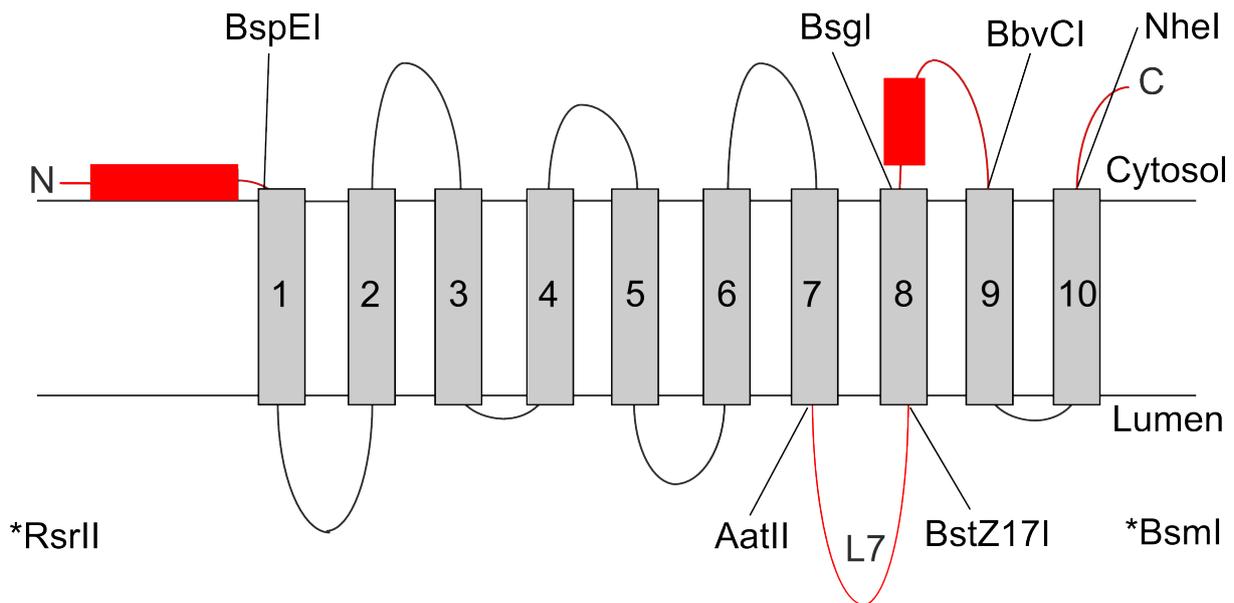


Abbildung 24: schematische Darstellung eines Topologiemodells von Sec61p mit den neuen Schnittstellen (RsrII, BspEI, AatII, BstZ17I, BsgI, BbvCI, NheI). In Rot dargestellt sind die austauschbaren Bereiche, was die Ligation von zufällig mutierten Teilabschnitten aus der EP-PCR ermöglicht. Mit \* markierte Schnittstellen liegen upstream (RsrII) bzw. downstream (NheI) des cds.

Wegen der geringen Größe der ausgewählten Bereiche wurde die maximal zulässige Menge  $MnCl_2$  titriert (Abbildung 25). Diese sollte sicherstellen, dass die maximale Mutationsrate erreicht wird, bei der die Amplifikation des Fragments noch gewährleistet ist (Abbildung 25).

Tabelle 14: Übersicht der substituierenden Punktmutationen um neue Restriktionsschnittstellen zu etablieren, die den N- oder C-Terminus, Loop 7 oder Loop 8 flankieren.

Konstrukt	Basensubstitutionen
<i>sec61N</i>	T424C; A430G; A514G;
<i>sec61L7</i>	T1345G; C1537A
<i>sec61L8</i>	C1564T; T1738C; T1741C; T1742A; C1743G; T1744C
<i>sec61C</i>	A1783T; T1784A; C1785G; A1889G; T1890C

Dazu wurde die PCR mit unterschiedlichen Konzentrationen  $MnCl_2$  durchgeführt (0,25-1,75 mM). Da der Mutagenesepuffer auch  $MgCl_2$  liefert, fehlt der PCR-Reaktion ohne Mutagenesepuffer das notwendige  $MgCl_2$  (0 mM) zur Amplifikation. Die Konzentration an zugegebenen Schwermetallionen kann nicht beliebig hoch gewählt werden, da bei zu hohen Salzkonzentrationen keine Amplikons mehr nachgewiesen werden können. Deshalb wurde für alle weiteren Experimente eine Konzentration von 1 mM  $MnCl_2$  gewählt (Abbildung 25).

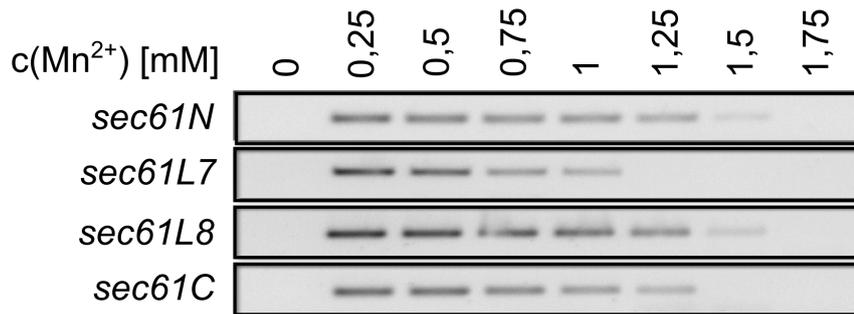


Abbildung 25: Bestimmung der maximalen Konzentration an MnCl<sub>2</sub>. Die maximale Konzentration an MnCl<sub>2</sub> wurde titriert. Für alle weiterführenden Experimente wurden 1 mM MnCl<sub>2</sub> zugegeben. Diese Konzentration gewährleistet eine hohe Mutationsrate, bei noch ausreichender Amplifikation der ausgewählten Bereiche. Ohne die Zugabe des Mutagenesepuffers erfolgt, durch den Mangel an MnCl<sub>2</sub>, keine Amplifikation.

In Hefestamm KRY461 wird die genomische Deletion von *SEC61* mit einem *SEC61*-Plasmid unter der Kontrolle eines Galaktosepromotors gerettet, dessen Aktivität bei Bedarf durch Glucose reprimiert werden kann (Abbildung 4). Dies ermöglicht die ausschließliche Expression des mutierten *sec61*. Um zu gewährleisten, dass das Umschalten der Expression durch den Wechsel von Gal auf Glc über Nacht erfolgt, wurden KRY461- und KRY462-Hefen (KRY461 mit genomischen *SEC61*) in YPG (2% Galaktose) angeimpft und ü.N. wachsen gelassen. Danach wurden die Zellen im gleichen Volumen YPD (2% Glucose) resuspendiert. Nach 4 h wurde im Abstand von 2 h Proben entnommen, aufgeschlossen, in einer SDS-PAGE analysiert und auf Sec61p-Gehalt und Akkumulation von Vorläuferproteinen untersucht.

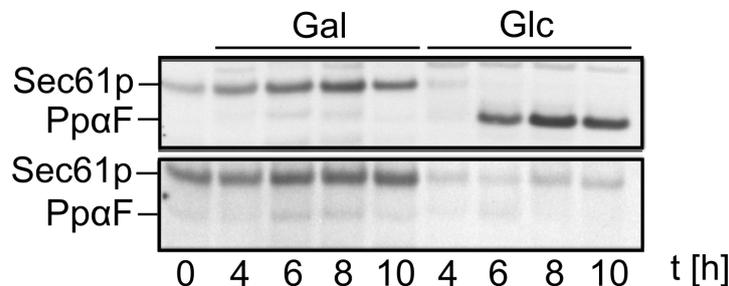


Abbildung 26: Veränderung der Sec61p-Expression durch den Wechsel von Galaktose zu Glucose. Hefen der Stämme KRY461 und 462 wurden über Nacht in YP mit Galaktose herangezogen und zum Zeitpunkt t=0 in YPD resuspendiert. Nach 4 h wurde im Abstand von 2 h Proben entnommen, die Hefen aufgeschlossen und auf Sec61p-Gehalt und PpaF-Akkumulation untersucht. Der Stamm KRY462 entspricht dem KRY461-Stamm, besitzt aber weiterhin das genomische *SEC61*.

Nach 4 h beträgt die Sec61p-Menge in KRY461 nur noch 24% der ursprünglichen Menge, eine Akkumulation des PpαF ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu erkennen (Abbildung 26). Erst zu späteren Zeitpunkten führt der längerfristige Verlust von Sec61p zu einer Akkumulation des αF-Vorläuferproteins (Abbildung 26). Im Stamm KRY462 bleibt wegen der genomischen Kopie von *SEC61* eine Akkumulation des PpαF aus (Abbildung 26).

Für das Screening wurde der Wechsel der Zuckerquelle für 24 h durchgeführt um sicher zu gehen, dass kein wildtypisches Sec61p mehr vorhanden ist.

Das Screening erfolgte in mehreren Phasen: (i) zufällige Mutation innerhalb der Zielbereiche wurden durch eine EP-PCR mit Primern, die diesen Bereich flankieren eingefügt und (ii) die EP-Amplikons und das passende Plasmid geschnitten, ligiert und in Bakterien amplifiziert. (iii) Zuletzt wurden die Plasmide wieder isoliert, in den Hefestamm KRY461 transformiert und (iv) im Colony-Blot auf CPY\*-Degradationsstörungen untersucht.

Dazu wird die Expression des CPY\* durch Inkubation auf 1% KAc-Minimalmedium verstärkt, die Translation für 10 h mit CHX inhibiert und anschließend die Klone auf der Nitrocellulose lysiert und mit Antikörpern detektiert (Knop *et al.*, 1996).

## VII.5 Eine neue kältesensitive Mehrfachmutante mit Defekten im posttranslationalen Import

Durch das Screening wurde eine neue Mutante mit vier Punktmutationen in Loop 7 mit vier Punktmutationen, *sec61EP* (Q312L, L342M, S351P, L357P).

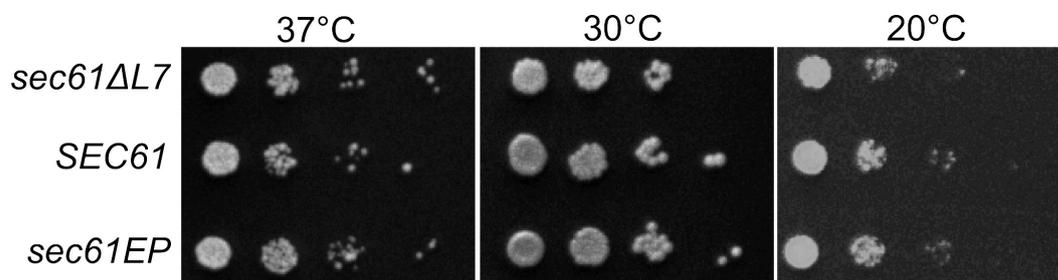


Abbildung 27: Droptest zur Charakterisierung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen. Hefen (*sec61ΔL7*, *SEC61*, *sec61EP*) wurden in der exponentiellen Phase auf YPD-Platten getropft und für 3 d bei den entsprechenden Temperaturen wachsen gelassen. Anschließend wurde das Wachstum dokumentiert.

Die Hefen wuchsen über Nacht, wurden ausgezählt und  $10^4$  bis  $10^1$ -Zellen auf YPD aufgetropft. Nach 3 d bei 30°C und 37°C und 7 d bei 20°C wurde das Wachstum der Hefen dokumentiert (Abbildung 27). Zur Kontrolle wurde eine kältesensitive Mutante (*sec61ΔL7*) gewählt, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird (VII.6). Die vier Mutationen haben keinen Einfluss auf die Vitalität von Hefen bei 37°C, bei 30°C und 20°C (Abbildung 27).

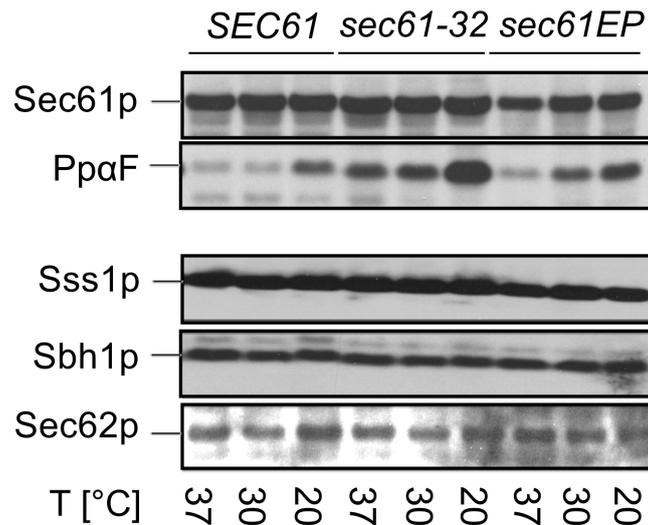


Abbildung 28: Bestimmung der Akkumulation des PpaF und der Expressionslevel von Sss1p, Sbh1p und Sec62p. Hefen wurden bei 37°C, 30°C und 20°C inkubiert, quantitativ gleiche Mengen geerntet und lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in einer SDS-PAGE aufgetragen und der Proteinlevel von Sec61p, Sec62p, Sss1p, Sbh1p und PpaF bestimmt. Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen die genannten Proteine.

Übernachtukturen wurden in der exponentiellen Phase geerntet nachdem sie für 3 h bei 37°C, 30°C und 20°C wuchsen. Die Extrakte wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Westen-Blot gegen Sec61p, Sss1p, Sbh1p, Sec62p und PpaF untersucht. Die Mutante *sec61EP* zeigt eine verstärkte Akkumulation des PpaF und damit Defekte in der posttranslationalen Translokation (Abbildung 28). Die Stärke der Akkumulation ist temperaturabhängig und niedrige Temperaturen verstärken den Effekt (Abbildung 28). Die Akkumulation ist aber nicht so stark ausgeprägt, wie die der *sec61-32*-Kontrolle (Abbildung 28). Eine Expressionssteigerung anderer Untereinheiten des post- und cotranslationalen Komplexes konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 28).

Hefen wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys markiert und in einer Pulse-Chase Analyse untersucht. Diese zeigt eine Akkumulation von CPY\* bei Beginn des Experiments in

*sec61EP* (*SEC61* vs. *sec61EP* zum Zeitpunkt t=0), aber kein Effekt auf die Degradation (Abbildung 29).

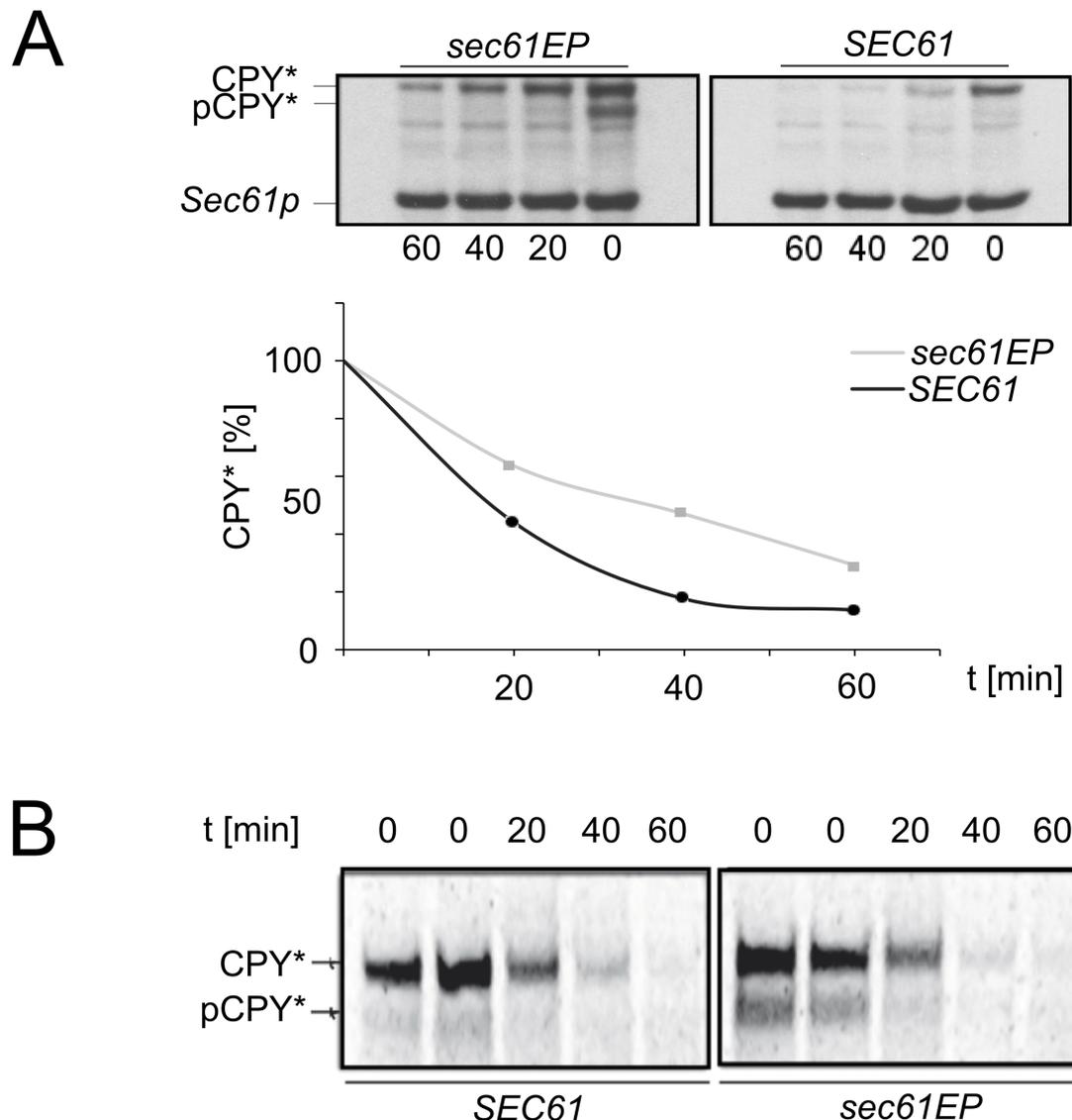


Abbildung 29: CHX-Chase zur Bestimmung der CPY\*-Degradationsrate in *sec61EP*. Hefen der beiden Stämme *sec61EP* und *SEC61* wurden zu Beginn des Experiments mit CHX behandelt um die Translation zu inhibieren (t=0). Im Abstand von 20 min wurden quantitativ gleiche Mengen entnommen, Hefen lysiert und Proteine in einer SDS-PAGE und im Western-Blot auf den CPY\*-Gehalt untersucht. **B** Pulse-Chase Analyse zur Untersuchung der Degradation von CPY\* in *sec61EP*. *SEC61* und *sec61EP*-Hefen wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys markiert und die Degradation von CPY\* über einen Zeitraum von 1h bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager.

Die Vierfach-Mutante *sec61EP* ist kältesensitiv und Tunikamycin-sensitiv (Abbildung 27). Sie zeigt Defekte im posttranslationalen Import und im CHX-Chase eine verminderte Degradationsrate (Abbildung 28 und Abbildung 29). Die Pulse-Chase-Analyse zeigt dagegen keine Beeinträchtigung der ER-abhängigen Degradation (Abbildung 29).

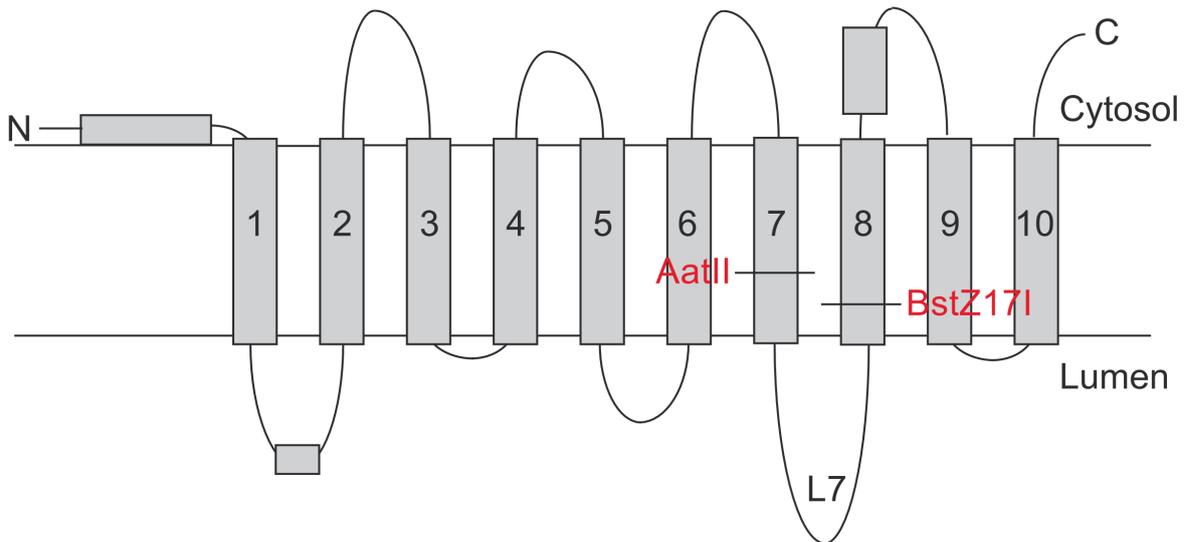
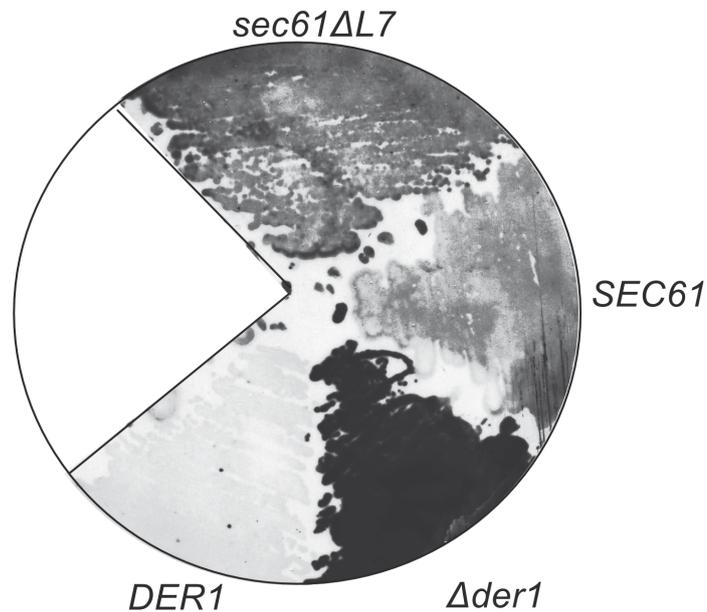
## VII.6 Charakterisierung von *sec61ΔL7*-Hefen

### VII.6.1 Einfluss der Deletion von Loop 7 auf Vitalität, Translokation und Degradation

Im Screen wurde wiederholt eine Mutante ohne Loop 7 isoliert, die durch die Religation des geschnittenen Vektorrückgrats entstanden ist (*sec61ΔL7*; Abbildung 30).

Abbildung 30 fasst die Entdeckung der *sec61ΔL7*-Mutante zusammen: Die Schnittstellen AatII und BstZ17I wurden durch Mutationen eingefügt und geschnitten (Abbildung 30 A). Anstatt ein mutiertes Amplikon zu ligieren, wurde in einigen Klonen das Plasmid-Rückgrat ohne Loop 7 religiert. Diese Klone sind auffällig im Screen wegen ihrer erhöhten CPY\*-Stabilität (Abbildung 30 B). Die Sequenzierung zeigt, dass die Aminosäuren 305-371 durch -Arg-Glu- ersetzt wurden (Abbildung 30 C).

Hefen mit *Sec61ΔL7p* sind bei 30°C vital aber kältesensitiv (Abbildung 31 A). Die Verdopplungszeit entspricht derjenigen des Wildtyps (Abbildung 31 B), die Zellteilungsrate ist in etwa doppelt so hoch (3,7h) verlängert (2,5h) im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 31 C).

**A****B****C**

Sec61p **SNIFLISQILFQKYPTNPLIRLIGVWVGIRPGTQG**  
**PQMALSGLAYYIQPLMSLSEALLDPIKTIVYIT**

Sec61ΔL7p **SNIFRETIVYIT**

Abbildung 30: Die Mutante *sec61ΔL7* wurde wegen Degradationsdefekten im Colony-Blot entdeckt. **A** Das topologische Modell von Sec61p zeigt die Lage der beiden neuen Schnittstellen AatII und BstZ171. **B** Klone in einem ERAD-Screen gegen CPY\* wurden isoliert und erneut auf einer Platte ausgestrichen. Die Deletion von Loop 7 führt zu einer Akkumulation von CPY\*. **C** Die Mutante wurde sequenziert und die AS-Sequenz abgeleitet. Die Religation ohne das Loop 7-Insert führt zu einer Deletion der Aminosäuren 305-371 und deren Substitution durch Arg und Glu.

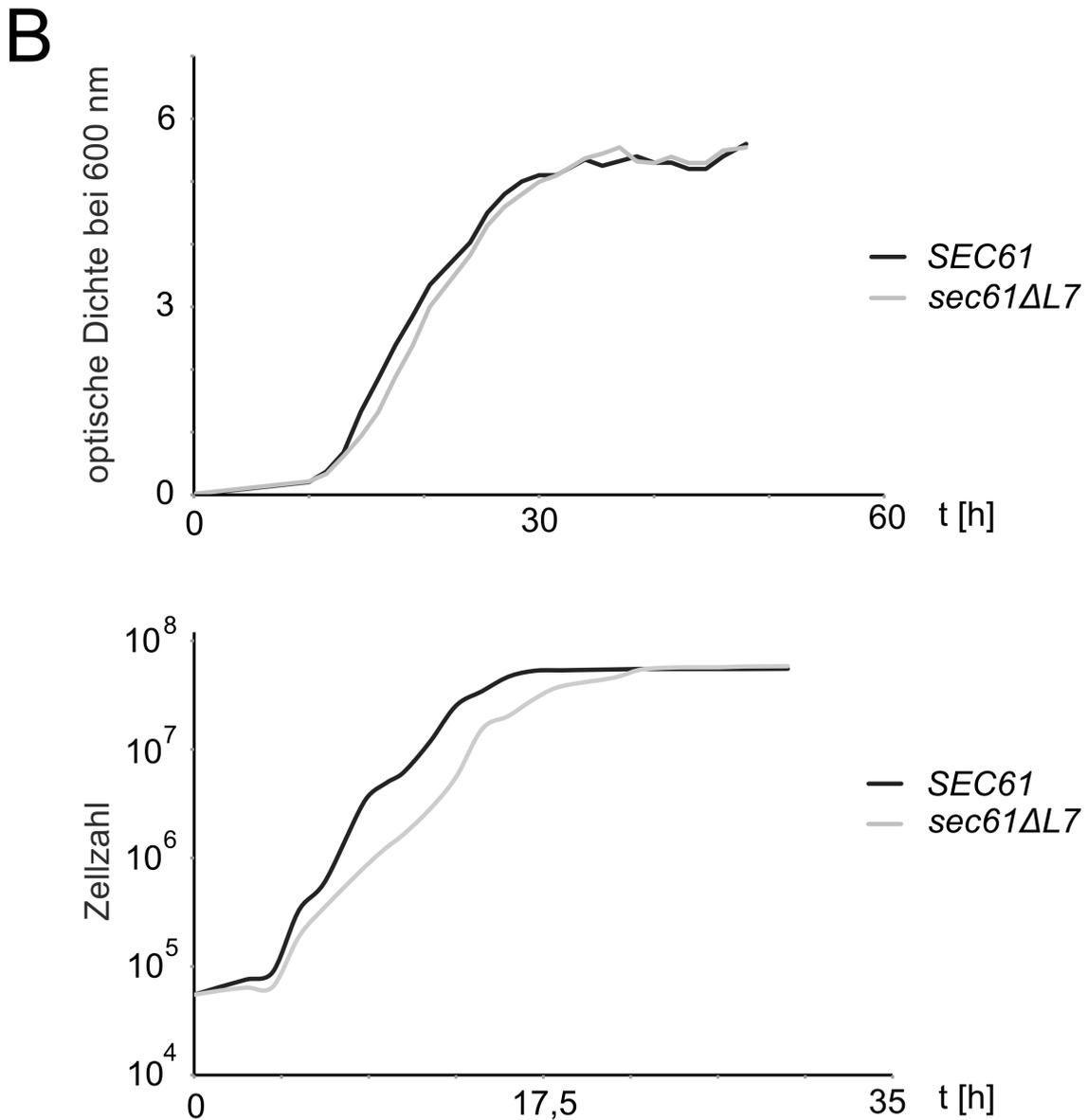
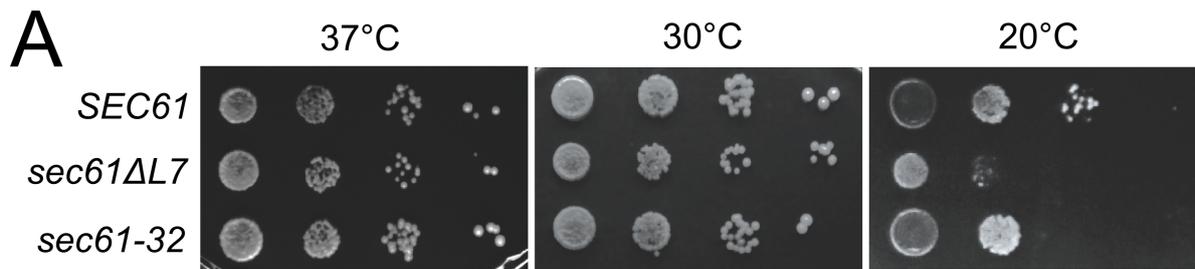


Abbildung 31: Vitalität von Hefen bei einem Verlust von Loop 7 in Sec61p. Hefen der Stämme *sec61ΔL7*, *SEC61* und *sec61-32*, wurden in einer Verdünnung von  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen auf YPD getropft und nach 3 d auf Wachstum untersucht. **B** Wachstum bei 30°C durch Bestimmung der  $OD_{600}$ . **C** Wachstum bei 30°C durch Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Kammer.

Hefen der *sec61ΔL7*-Deletionsmutante wurden in Gegenwart von 5 mM EGTA in einem Verdünnungsexperiment auf YPD-Platten aufgebracht und auf verändertes Wachstum beobachtet.

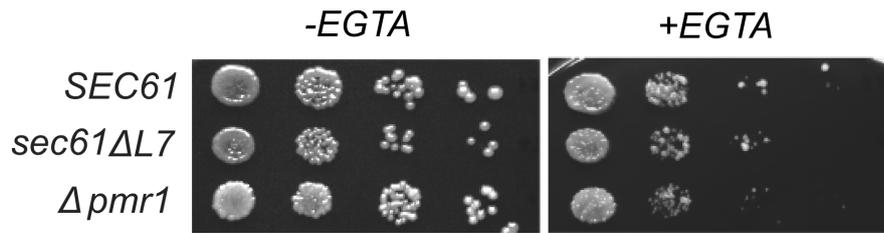


Abbildung 32: KRY461-Hefen wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen auf eine YPD-Platte mit und ohne 5 mM EGTA getropft und bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. EGTA entzieht der Zelle das notwendige  $\text{Ca}^{2+}$  und führt zu Wachstumsinhibition in Zellen deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase gestört ist. Ein *PMR1*-Deletionstamm ( $\Delta pmr1$ ) diente der Kontrolle.

Der Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$  hat keinen Einfluss auf das Wachstum von *sec61ΔL7*-Hefen, damit wirkt sich der Verlust von Loop 7 nicht auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase aus (Abbildung 32).

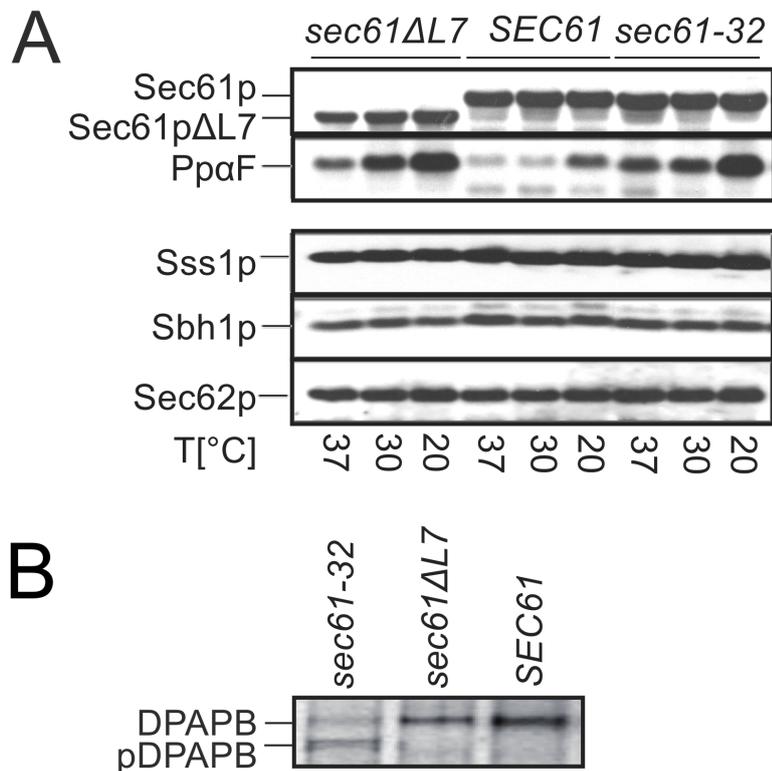


Abbildung 33: Der Verlust von Loop 7 führt zu einer Akkumulation des PpaF aber nicht von DPAPB. **A** Es wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Untereinheiten des posttranslationalen und cotranslationalen Importkomplexes (Sec61p, Sss1p, Sbh1p und Sec62p) und gegen PpaF durchgeführt. Der Verlust von Loop 7 von Sec61p zeigt sich im Western Blot durch einen Laufunterschied von 6 kDa. **B** Hefen (*sec61-32*, *sec61ΔL7* und *SEC61*) wurden radioaktiv markiert, lysiert und Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen DPAPB gefällt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Phosphorimager. pDPAPB= DPAPB-Vorläufer.

Um zu überprüfen, ob der Verlust von Loop 7 zu posttranslationalen Importdefekten führt wurden Ganzzellextrakte angefertigt und nach der SDS-PAGE gegen PpaF

geblottet. Zusätzlich wurde der Expressionslevel von Sss1p, Sbh1p, Sec62p und Sec61p bzw. Sec61 $\Delta$ L7p bestimmt.

Sec61 $\Delta$ L7p ist im Western-Blot ca. 6 kDa kleiner, was dem theoretisch berechneten Laufunterschied bei einem Verlust der AS 305-371 entspricht (Abbildung 33). Der Verlust von Loop 7 führt zu starken posttranslationalen Translokationsdefekten die denjenigen in *sec61-32*-Hefen entspricht (Abbildung 33).

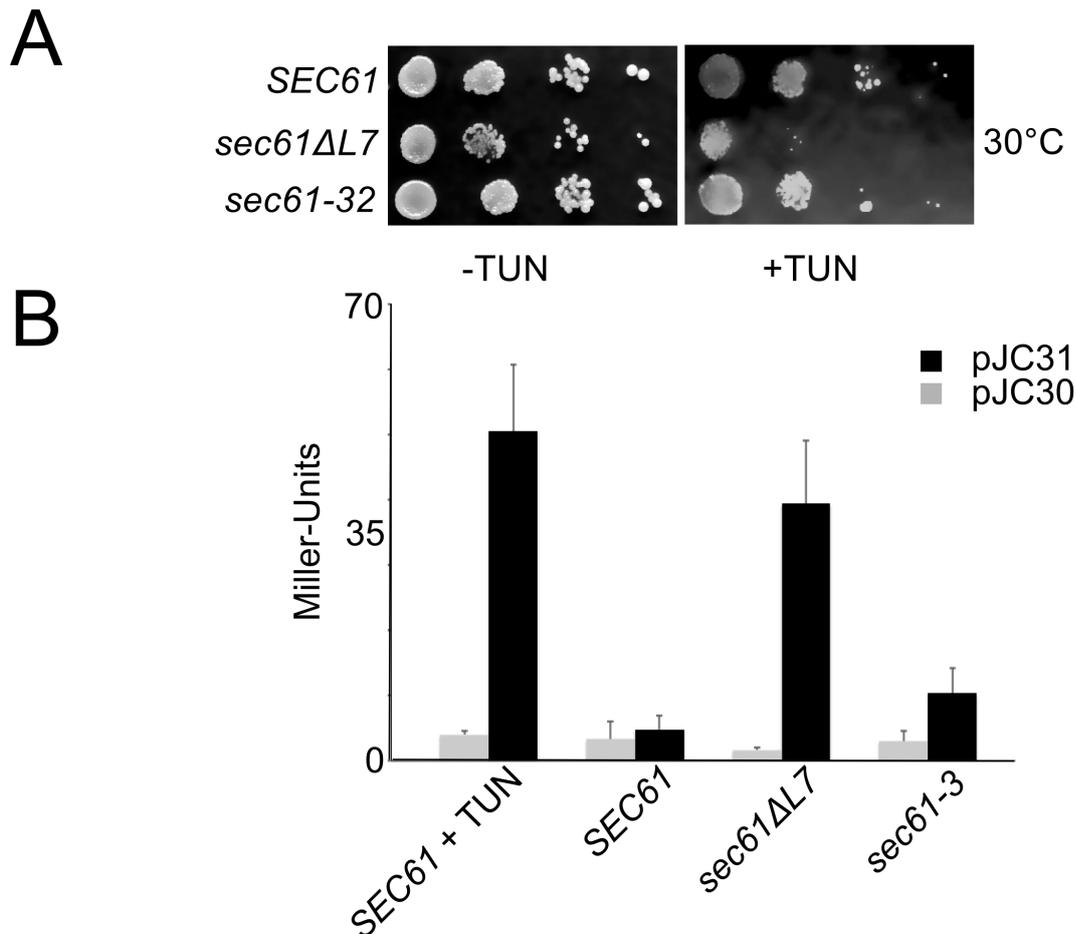


Abbildung 34: *sec61 $\Delta$ L7*-Hefen sind sensitiv gegenüber Tunikamycin (TUN). **A** Hefen wurden in einer Verdünnungsreihe ( $10^4 - 10^1$  Zellen) getropft und das Wachstum nach 6 d dokumentiert. Die Sensitivität gegenüber Tunikamycin führt zu einer Wachstumsinhibition. **B** Hefen der genannten Stämme (*SEC61*, *sec61 $\Delta$ L7*, *sec61-3*) wurden mit Reporterplasmiden (pJC30 und pJC31) transformiert, die beide für die  $\beta$ -Galaktosidase kodieren. Im Plasmid pJC31 ist die  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des UPR (Unfolded Protein Response Element), dass bei aktivierter UPR die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase steigert. Zur Kontrolle wurden *SEC61*-Hefen mit Tunikamycin behandelt (+TUN).

Um Defekte im cotranslationalen Import zu bestimmen wurden Hefen für 15 min bei 20°C mit  $^{35}$ S-Met/Cys markiert und mit spezifischen Antikörpern gegen das cotranslational importierte DPAPB gefällt (Pilon *et al.*, 1998). Hefen des *sec61 $\Delta$ L7*-Stamm zeigen, im Vergleich zum Kontrollstamm KRY157 keinen Defekt

im Import von DPAPB. KRY157 ist ein *sec61-32*-Stamm indem *sec61-32* mit einem N-terminalem His-Tag versehen ist (Abbildung 33; Pilon *et al.*, 1997). Dieser ist als Kontrolle besser geeignet, da sein cotranslationaler Defekt stärker ausgeprägt ist.

Um zu untersuchen, wie der Verlust von Loop 7 sich auf die Sensitivität gegenüber Tunikamycin auswirkt, wurden *sec61ΔL7*-, *sec61-32*- und *SEC61*-Hefen in einer Verdünnungsreihe auf YPD mit 0,5 µg/ml Tunikamycin getropft. Im Vergleich zu der Kontrolle ohne Tunicamycin zeigt sich ein verringertes Wachstum von *sec61ΔL7*-Hefen. Diese Inhibition ist wesentlich stärker als bei *sec61-32*-Hefen (Abbildung 34 A). Der β-Galaktosidaseassay bestätigt die hohe UPR-Induktion der im Stamm *sec61ΔL7* (Abbildung 34 B).

### **VII.6.2 Untersuchungen zur Degradation von KHN, KWW und Deg1:Sec62p in *sec61ΔL7*-Hefen**

Die Deletion von Loop 7 wurde anschließend auf Probleme in der ER assoziierten Degradation (ERAD) untersucht, dazu wurde die Degradation von CPY\* in Pulse-Chase- und CHX-Chase-Analysen beobachtet.

*sec61ΔL7*- und *SEC61*-Hefen wurden durch Zugabe von <sup>35</sup>S-Met/Cys zum Zeitpunkt t=0 markiert und im Abstand von 20 min Proben entnommen. Diese Proben wurden aufgeschlossen und CPY\* in einer spezifischen Immunpräzipitation gefällt, denaturiert, in einer SDS-PAGE analysiert und mit einem Phosphorimager quantifiziert. Die Auswertung zeigt, wie sehr die Translokation beeinträchtigt ist: In *sec61ΔL7*-Hefen transloziert CPY\* sehr langsam (Abbildung 35). Dieser Prozess ist in wildtypischen Zellen, wegen seiner hohen Geschwindigkeit, nicht messbar ist. Das importierte CPY\* wird anschließend nur sehr langsam wieder exportiert und degradiert (Abbildung 35 A). Obwohl es schwierig ist zwischen posttranslationalen Importdefekten und gestörtem Exportdefekten zu unterscheiden, ist der beschriebene ERAD-Defekt in *sec61ΔL7* der stärkste bisher beobachtete.

*SEC61* und *sec61ΔL7*-Hefen wuchsen bis zur exponentiellen Phase und wurden dann mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt. Im Abstand von 20 min wurden Proben entnommen und Ganzzellextrakte angefertigt. Quantitativ vergleichbare Mengen wurden im Western-Blot auf CPY\* und Sec61p-Gehalt untersucht.

Im Stamm *sec61ΔL7*-akkumuliert der CPY\*-Vorläufer (pCPY\*) stark und nur wenig pCPY\* wird über die ER-Membran ins ER-Lumen transloziert. CPY\* ist

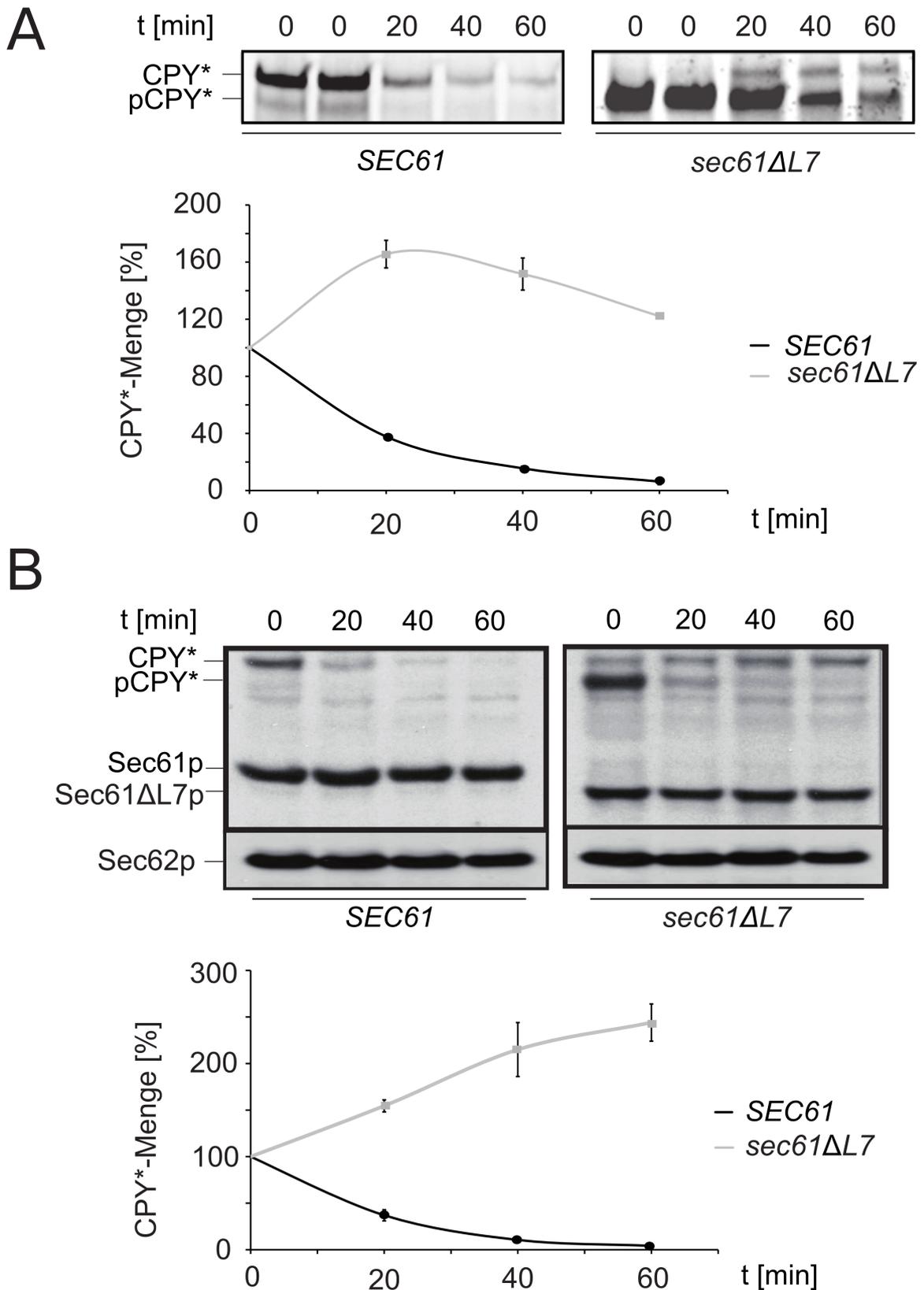


Abbildung 35: Pulse-Chase- und CHX-Chase-Analyse der *sec61ΔL7*-Mutante zur Bestimmung eines möglichen ERAD-Defekts. **A** Hefenstämmen wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  für 5 min radioaktiv markiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, aufgeschlossen und CPY\* gefällt. **B** Die Translation wurde mit CHX arretiert ( $t=0$ ) und zu den indizierten Zeitpunkten Proben entnommen und aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben im Western-Blot gegen CPY\* und Sec61p gefärbt und mit ImageJ quantifiziert. pCPY\*= cytoplasmatisches CPY\*, CPY\*= ER-residentes CPY\*.

ein ERAD-Substrat, wird aber nicht ausreichend ins Cytosol transportiert. Dadurch akkumuliert CPY\* zunehmend im ER-Lumen und erreicht nach 60 min die 2,5-fache Menge im Vergleich zum Versuchsbeginn (t=0; Abbildung 35 B).

Hefen des Stammes *sec61ΔL7* wurden mit Plasmiden transformiert, die für weitere ERAD-Substrate kodieren. KHN ist ein lumenales ERAD-Substrat mit einer Halbwertszeit von 35 min (Vashist *et al.*, 2004; Abbildung 3). Durch die Fusion von KHN mit einer transmembranen Domäne (Wsc1p) und einer cytosolischen Domäne wurde das membranständige ERAD-Substrat KWW etabliert, dessen Halbwertszeit ebenfalls bei 35 min liegt (Vashist *et al.*, 2004; Abbildung 3).

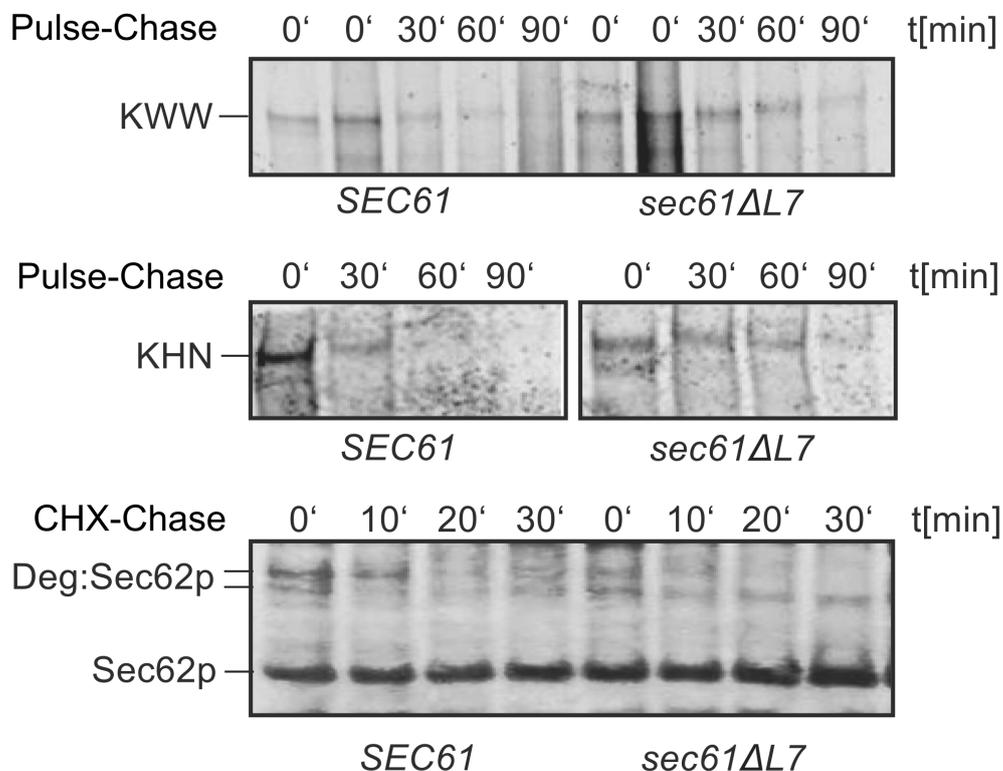


Abbildung 36: Effekt auf die Degradation von KHN, KWW und Deg1:Sec62p beim Verlust von Loop 7 von Sec61p. Hefen wurden mit Plasmiden transformiert, die eine Expression der ERAD-Substrate ermöglichen (KHN und KWW). Hefen wurden in der frühen exponentiellen Phase für 5 min mit <sup>35</sup>S-Met/Cys markiert und anschließend mit nicht radioaktivem <sup>35</sup>S-Met/Cys behandelt. Hefen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten lysiert, Proteine mit spezifischen Antikörpern gefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Banden wurden mit einem Phosphorimager detektiert (Oben und Mitte). Hefen wurden mit einem Plasmid, das die Expression von Deg1:Sec62p ermöglicht, transformiert. Zu Beginn der exponentiellen Phase wurde CHX zugegeben um die Translation zu inhibieren und anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten Extrakte angefertigt und die Proteine in einer SDS-PAGE analysiert und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert (Unten).

KWW ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da die cotranslationale Insertion in die Membran nicht beeinträchtigt ist, wie für DPAPB gezeigt werden

konnte (Abbildung 33). Bei einer Deletion von Loop 7, ist die Degradation von KHN und KWW im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt, wobei der Defekt für KHN stärker ausfällt (Abbildung 36 Oben und Mitte).

Deg1:Sec62p ist ein Membranprotein, dass von Sec62p abgeleitet ist. Durch die Fusion eines Degradationssignals wird Deg1:Sec62p von der ERAD-Maschinerie erkannt und schnell abgebaut ( $t_{1/2}$  = 13 min Scott und Schekman 2008). Deg1:Sec62p liegt in zwei verschiedenen Spezies vor, einer glykosylierten langsam migrierenden und einer unglykosylierten schnell migrierenden Variante. Im CHX-Chase scheint besonders die unglykosylierte Spezies in ihrer Degradation beeinträchtigt zu sein (Abbildung 36 unten).

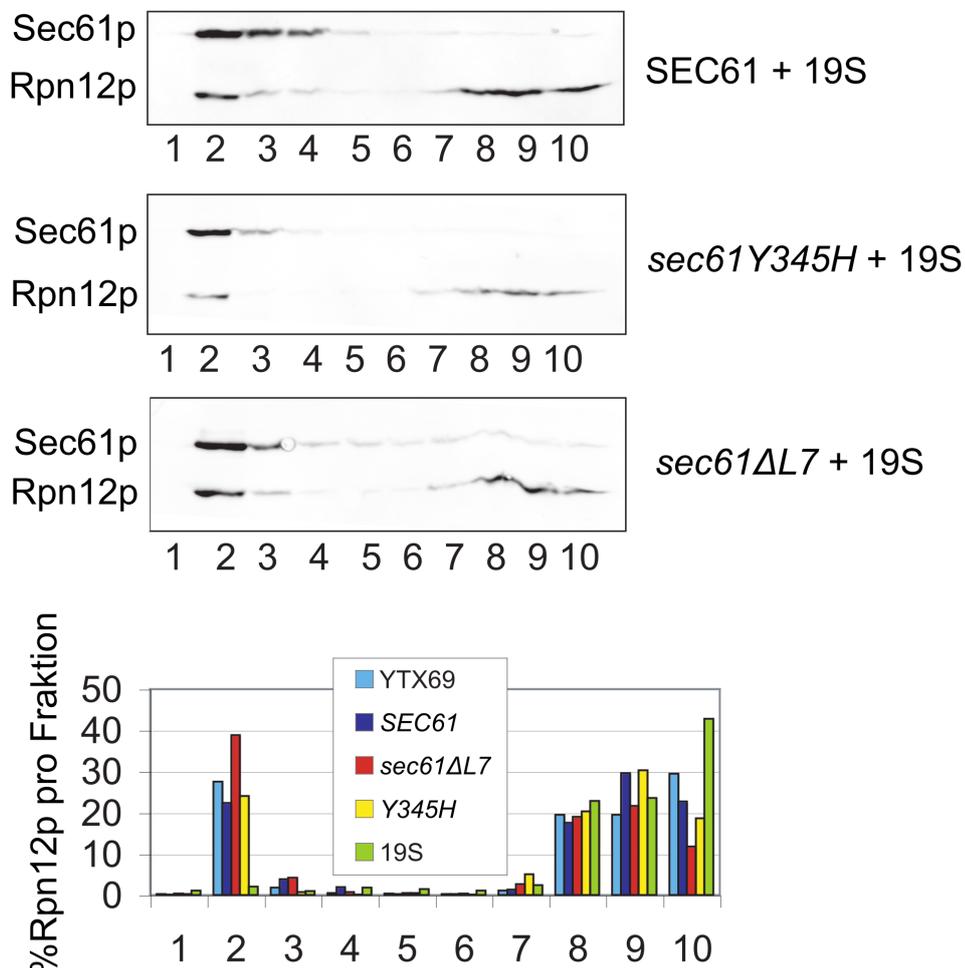


Abbildung 37: Bindung des 19S Proteasom an *SEC61*, *sec61Y345H* und *sec61ΔL7* Proteoliposome. Mikrosomen aus dem Wildtyp oder aus *sec61*-Mutanten wurden präpariert, von Ribosomen befreit, solubilisiert und Proteine in Proteoliposomen rekonstituiert. Membranen wurden mit aufgereinigten 19S-Partikel in der Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert und in einem 1,8 M Sucrosegradienten für 1 h bei 200000xg zentrifugiert. Fraktionen wurden, von oben beginnend, gesammelt und in einer SDS-PAGE mit Western-Blot auf Sec61p und Rpn12p untersucht. 19S-Partikel ohne Membranen verbleiben am Boden des Gradienten. YTX69 dient als Referenz für Proteasom und Ribosom-Bindeexperimente.

In einer Kooperation mit der AG Kalies wurde überprüft, ob die Y345H-Mutation oder die Deletion von Loop 7 von Sec61p Effekte auf die Interaktion von Sec61-Kanälen und Proteasomen hat. Dazu wurden Proteoliposome vom Wildtyp, *sec61Y345H* und *sec61ΔL7* Mikrosomen vorbereitet, die zuvor mit Puromycin/Hochsalz behandelt wurden, und Bindeexperimente mit aufgereinigten 19S Proteasom-Untereinheiten durchgeführt (Kalies *et al.*, 2005). Die Mutante *sec61Y345H* (gelb) zeigte keinen Unterschied in der Proteasombindung im Vgl. zu wildtypischen Hefen (blau) (Abbildung 37). Die Bindung des 19S-Partikel an *sec61ΔL7* Proteoliposome war geringfügig höher als an *SEC61*-Proteoliposome (Abbildung 37 Vgl. rot und blau). Die beobachteten ERAD-Defekte sind nicht das Resultat einer defekten Proteasombindung an den Sec61-Kanal in der ER-Membran.

Überraschenderweise sind *sec61ΔL7*-Hefen vital bei 30°C (Abbildung 31). Hefen des *sec61ΔL7*-Stammes sind sensitiv gegenüber Tunikamycin und niedrigen Temperaturen (Abbildung 31 und Abbildung 34). Der posttranslationale Import ist gestört, aber der Import von DPAPB ist unbeeinträchtigt (Abbildung 33). Im CHX-Chase und Pulse-Chase führt ein Verlust von Loop 7 zu einer starken Akkumulation von CPY\*, KHN und KWW (Abbildung 35 und Abbildung 36). Hefen mit *sec61ΔL7* sind nicht sensitiv gegenüber EGTA (Abbildung 32).

### **VII.6.3 Der Verlust von Loop 7 führt zu einer Instabilität des Sec61-Komplex**

Der heptamere Sec-Komplex ist instabil bei einer Solubilisierung mit TritonX, aber der trimere Sec61-Komplex nicht (Falcone *et al.*, 2011).

Mikrosomen wurden in TritonX solubilisiert und anschließend in einem 0-15% Sucrosegradient aufgetrennt, dreizehn Fraktionen abgenommen und in einem Western-Blot gegen Sec61p, Sbh1p und Sss1p analysiert. In *SEC61*-Hefen (co-) sedimentieren die Untereinheiten des Sec61-Komplex in den Fraktionen 5-9 (Sss1p und Sbh1p) und damit im Bereich des trimeren Komplex (Abbildung 38). Durch die Deletion von Loop 7 verschieben sich die sedimentierten Proteine zu den Fraktionen 1-4 und damit in diejenigen Fraktionen, die monomere Sss1p und Sbh1p enthalten (Abbildung 38). Die Verteilung von *Sec61ΔL7p* konzentriert sich in den Fraktionen 5, 8 und 9 und unterscheidet sich demnach sehr von der gleichmäßigen Verteilung in *SEC61*-Hefen (Abbildung 38).

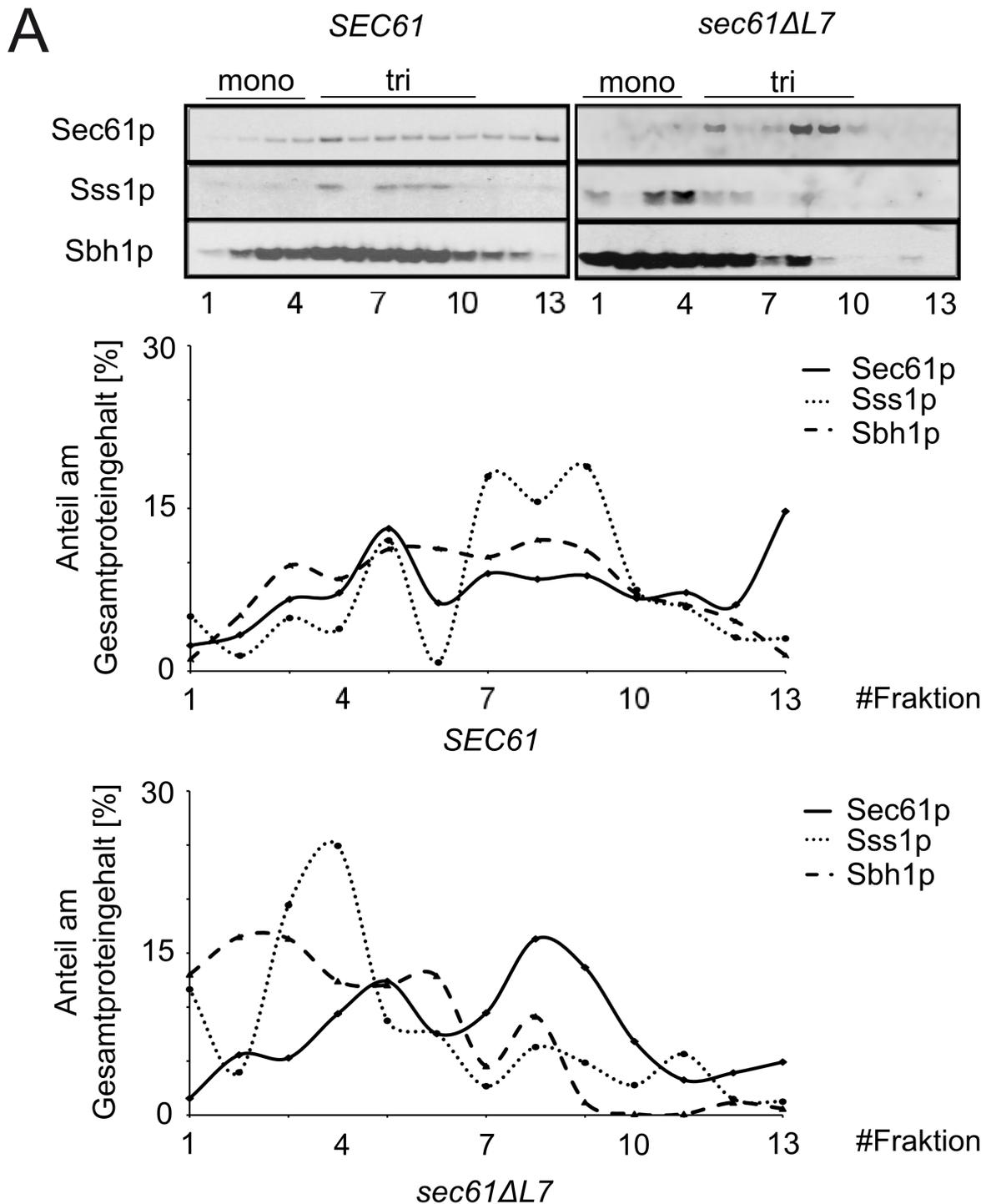


Abbildung 38: Untersuchung zur Instabilität des trimeren Komplex von *sec61ΔL7*-Hefen. Mikrosomen von *SEC61* und *sec61ΔL7*-Hefen wurden in TritonX solubilisiert und anschließend in einem linearen Sucrosegradienten weiter untersucht. Fraktionen 1-13 wurden abgenommen und anschließend im Western Blot auf die Untereinheiten des trimeren Komplex (Sec61p, Sss1 und Sbh1p) untersucht. Monomeres Sss1p und Sbh1p laufen in den Fraktionen 1-4, im trimeren Komplex gebundenes Sss1p und Sbh1p laufen in den Fraktionen 5-10.

Der Verlust von Loop 7 führt zu einer Instabilität des trimeren Komplex durch eine beeinträchtigte Bindung von Sec61p zu Sss1p und Sbh1p (Abbildung 38).

#### **VII.6.4 Loop 7 vermittelt Sec61p in die freie Fraktion**

Neben dem Sec61-Komplex existieren noch zwei weitere Fraktionen: der Sec-Komplex und die freie Fraktion, deren Funktion unbekannt ist.

Mikrosomen wurden mit Digitonin solubilisiert und die Sec61-Fraktion durch Ultrazentrifugation entfernt. Die Behandlung mit Digitonin ermöglicht die Extraktion des Sec-Komplex unter stabilen Bedingungen. Der Sec-Komplex im Überstand (Lysat), wurde anschließend in einer sättigenden ConA-Präzipitation gefällt (ConA) und auf den Gehalt von Sec61p und Sec62p untersucht. ConA bindet an glykosylierte Untereinheiten, wie Sec71p, und kann diese spezifisch präzipitieren (Panzner *et al.*, 1995). Die freie Fraktion im Überstand wurde nach einer TCA-Fällung auf Sec61p und Sec62 untersucht. Abbildung 39 A zeigt den Western-Blot gegen Sec61p und Sec62p des Lysats und der beiden Fraktionen (SEC und Frei). Die Quantifizierung von Sec61p zeigt, dass die Fraktionierung gelungen ist, da der Anteil von Sec61p in der Bound-Fraktion und der Free-Fraktion vergleichbar ist mit der Ausgangsmenge an Sec61p des Digitoninextrakts (Abbildung 39 B links).



## VII.7 Die Mutationen im zusammenfassenden Überblick

Überblick über die charakterisierten Mutationen nach der Beendigung dieser Arbeit. Die Mutanten lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen: (i) mit ERAD-, Translokations- und Wachstumsdefekte (*sec61S2Y*, *sec61ΔL7*), (ii) mit ERAD ohne Wachstums und ohne Translokationsdefekte (*sec61Y345H*, *sec61M450N*), (iii) mit ERAD und Translokationsdefekten aber ohne Wachstumsdefekte (*sec61EP*) (iv) Mutationen ohne erkennbaren Phänotyp (*sec61F311Y*, *sec61P50S*). Tabelle 15 fasst die Eigenschaften der untersuchten Stämme zusammen und gibt einen Überblick.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Charakterisierung der *sec61*-Mutanten dieser Arbeit. (--- = negative Veränderung ; o= keine Veränderung; x= nicht untersucht). In die Tabelle übernommen wurden die Ergebnisse des Droptests (20°C, 30°C und 37°C), das Wachstum auf Tunicymycinplatten (0,25 und 0,50 µg/ml), die CHX- und Pulse-Chase-Analysen, sowie die Precursorakkumulation.

Name	Temp [°C]			TUN [µg/ml]		CHX	Pulse	Import	
	20	30	37	0,25	0,5			Post	Co
<i>sec61S2Y</i>	o	o	---	---	---	---	---	---	X
<i>sec61P50S</i>	o	o	o	o	x	o	x	o	x
<i>sec61F311Y</i>	o	o	o	o	x	o	x	o	x
<i>sec61Y345H</i>	o	o	o	o	---	---	---	o	x
<i>sec61M450N</i>	o	o	o	x	x	---	x	o	x
<i>sec61EP</i>	o	o	o	x	x	---	o	---	x
<i>sec61ΔL7</i>	---	o	o	---	---	---	---	---	o

## VIII. Diskussion

### VIII.1 Proteintranslokation über Membranen in extremen Habitaten

Die Proteinsekretion und die Membranproteinintegration sind essentielle Prozesse, die beide abhängig von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen der Signalpeptide und Transmembrandomänen mit Chaperonen, dem Translokationskanal und Membranlipiden sind (Reed *et al.*, 2013). Elektrostatische Wechselwirkungen werden stärker bei niedrigen Temperaturen, hydrophobe Interaktionen dagegen schwächer, was zu adaptiven Veränderungen in löslichen Proteinen führt, die in der Kälte funktionieren müssen (Fields und Somero, 1998; Russel, 2000; Gianese *et al.*, 2001; Leiros *et al.*, 2000; Petrescu *et al.*, 2000). An die Kälte angepasste Organismen, besitzen einen höheren Anteil ungesättigter Fettsäuren in ihren Membranen, welche die Interaktionen mit den hydrophoben Transmembrandomänen von Proteinen beeinflussen könnten (Nichols *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002; Dowhan und Bogdanov, 2009).

In diesem Teil der Arbeit über Signalpeptide von psychrophilen Gram-negativen Bakterien konnte gezeigt werden, dass klassische Signalpeptide und Lipoproteinsignalpeptide zu einem erhöhten Anteil an Ile tendieren (Tabelle 7 und Tabelle 8). In der Analyse der Konsensussequenz von Signalpeptiden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den spezifischen Positionen (Abbildung 9 und Abbildung 10). Dies bedeutet möglicherweise, dass die Verteilung der Aminosäureveränderungen stochastisch in psychrophilen Signalpeptiden ablaufen. Die Erhöhung des Ile-Gehalt manifestierte sich nicht in der Gesamthydrophobizität nach Kyte-Doolittle (Tabelle 6).

Psychrophile Bakterien tendierten zu einer geringeren Anzahl sekretorischer Proteine, auch wenn sich das für die untersuchten Signalpeptidklassen recht unterschiedlich verhielt (Tabelle 9). Dies könnte strukturelle Unterschiede widerspiegeln, die dazu führen, dass ein Teil der sekretorischen Proteine durch die vorhandenen Algorithmen nicht zu erkennen sind. Alternativ ist es möglich, dass psychrophile Bakterien wirklich weniger Proteine sezernieren als mesophile Bakterien. Dies könnte das Ergebnis des evolutionären Drucks der extremen Umwelt sein. Anstatt funktionslose Proteine in die Umgebung abzugeben, wäre es besser die Ressourcen für deren Expression komplett einzusparen.

Die Anzahl an sekretorischen Proteinen in dieser Analyse war generell relativ gering und erreichte nicht annähernd die Anzahl aus biochemischen Untersuchungen (Levine *et al.*, 2005). Diesen 20-30% stehen gerade einmal 1,5-3,5% vorhergesagte sekretorische Proteine entgegen, die möglicherweise eine Folge zu stringenter Parameter meiner Suche waren (Levine *et al.*, 2005). Durch eine Lockerung dieser, würde man aber auch falsch positiv erkannte Signalpeptide finden. Ein Ausweg aus diesem Dilemma wäre die Etablierung spezieller Algorithmen zur Identifikation sekretorischer Proteine aus extremophilen Organismen. Diese Algorithmen basieren aber oftmals auf einem Abgleich mit schon vorhandenen Datensätzen. Im Falle von SignalP 3.0 bestand der Datensatz aus 1192 eukaryontischen und 487 prokaryontische Signalpeptidsequenzen (Bendtsen *et al.*, 2004). Sekretorische Proteine psychrophiler Prokaryonten müssten dann aus dem Überstand einer Kultur isoliert und dann mittels MALDI identifiziert werden. Dann wäre es möglich für sequenzierte Organismen die Vorläuferformen der Proteine inklusive derer Signalsequenzen zu ermitteln. Dieser Datensatz könnte dann als Grundlage für einen eigenständigen Algorithmus zur Identifikation von sekretorischen Proteinen extremophiler Organismen dienen.

Die Länge der Signalpeptide psychrophiler Bakterien in meinen Untersuchungen unterscheidete sich nicht von derjenigen der mesophilen Bakterien (Tabelle 5). Für Transmembrandomänen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Länge und Ladungsverteilung und nur kleinere Änderungen in der Aminosäurekomposition im Vgl. zu Signalpeptide beobachtet (Tabelle 10 und Tabelle 11). Außer für CFB-Bakterien war der Anteil an Ile auch hier erhöht. Die vermehrte Inkorporation von Ile scheint eine wichtige Rolle für die Funktion in der Kälte zu spielen. Ile ist die hydrophobste Aminosäure nach der Bewertung von Kyte und Doolittle und die häufigere Verwendung kompensiert möglicherweise schwächere hydrophobe Interaktionen in der Membran bei niedrigen Temperaturen (Baldwin, 1986). Dieses Szenario erklärt aber nicht warum die Menge an Ile in Transmembrandomänen von *T. maritima* erhöht war (Tabelle 10). Alternativ könnte die vermehrte Verwendung von Ile zu einer höheren Stabilität von Signalpeptiden und Transmembrandomänen führen, so dass diese den extremen Bedingungen widerstehen können.

Anpassungen an die Kälte waren in Transmembrandomänen also kaum zu finden. Das bedeutet, dass trotz der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung der

Membran und der schwächeren hydrophoben Interaktionen bei niedrigen Temperaturen, Transmembrandomänen nur geringfügige Adaptionen an die extremen Bedingungen etablierten. Transmembrandomänen sind nicht einem wässrigen Milieu ausgesetzt, aber den Kräften in der Membran, die unabhängig von der Zusammensetzung der Membran, gleich sein könnten. Elektrostatische Interaktionen werden für die Orientierung von Proteinen in der Membran benötigt. Diese sind hauptsächlich eine Funktion des Translokationskanals, der in mesophilen und psychrophilen Bakterien stark konserviert ist (Abbildung 6; Abbildung 7 und Abbildung 8; Römisch *et al.*, 2003; Junne *et al.*, 2007).

Die SecY-Sequenzen der psychrophilen und mesophilen Bakterien wurden in meiner Studie verglichen (Abbildung 6 und Abbildung 7). In Psychrophilen und Mesophilen wurden hoch konservierte Bereiche in den Transmembrandomänen 2a, 4 und 10 und in den Loops zwischen Transmembrandomäne 6/7 und 8/9 gefunden (Abbildung 6). In allen untersuchten Bakterien waren die Isoleucine, die den sogenannten kontraktiven Ring bilden, hoch konserviert. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktionen zwischen den Aminosäuren des hydrophoben Rings und dem Signalpeptid in Psychrophilen konserviert sind (Abbildung 6). Aminosäuren, die die Orientierung im Kanal bestimmen, wurden in Sec61p von *S. cerevisiae* bestimmt (Junne *et al.*, 2007). Diese sind in vielen unterschiedlichen Bereichen des Moleküls verteilt und ihre Rolle ist unklar (Junne *et al.*, 2007). Die entsprechenden Positionen in *E. coli*, *V. cholerae* und den psychrophilen Bakterien sind konserviert, was dafür spricht, dass die Interaktionen für die Orientierung von Transmembrandomänen im Kanal sich nicht ändern (Abbildung 6 und Abbildung 7). Der Grad der Konservierung zwischen *E. coli* SecY und *T. maritima* SecY war zu gering um diese Reste zu identifizieren. Die Veränderungen in Signalpeptiden sind deshalb möglicherweise keine Anpassungen an den Translokationskanal sondern an lösliche Komponenten im Cytoplasma, wie SecA/B oder SRP.

Zusammenfassend zeigten meine Analysen, dass Signalpeptide sich nur geringfügig zwischen psychrophilen und mesophilen Bakterien unterscheiden. Diese Veränderungen tragen vermutlich dazu bei eine effiziente Translokation bei niedrigen Temperaturen zu gewährleisten. Trotz der veränderten Membranlipidzusammensetzung, unterliegen Transmembranproteine nicht dem gleichen selektiven Druck wie lösliche Proteine um in der Kälte zu funktionieren und zeigen deshalb kaum Anpassungen.

## VIII.2 N-Acetylierung der N-Termini von Sec61p und Sec62p

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit waren die N-Termini der Untereinheiten des trimeren und heptameren Komplexes. Um diese zu untersuchen wurden Mikrosomen aus einem Stamm isoliert, dessen Sss1p Untereinheit mit einem HA-Tag markiert war (Soromani *et al.*, 2012). Mikrosomen wurden in Digitonin solubilisiert und die Komplexe durch eine Anti-HA-Agarosesäule aufgereinigt. Die Untereinheiten wurden in einer SDS-PAGE analysiert und interessante Banden mittels MALDI identifiziert (Tabelle 13 und Abbildung 11). Bei der Suche nach posttranslationalen Modifikationen wurde beobachtet, dass Sbh1p und Sec62p an ihren N-Termini acetyliert sind (Tabelle 13). Da das tryptisch verdaute N-terminale Peptid in der MALDI-Analyse nicht nachweisbar war, liegen keine Daten über den N-Terminus von Sec61p vor. Eine N-Acetylierung für Termini mit -MSS- konnte aber nachgewiesen werden (van Damme *et al.*, 2012).

In einem ersten Ansatz zum Einfluss der N-Acetylierung auf Prozesse in denen Sec61p und assoziierte Untereinheiten involviert sind, habe ich Sec61p Funktionen in einem *Ard1p*-Deletionsstamm betrachtet, in dem die enzymatisch aktive Untereinheit von NatA fehlt und der deshalb N-Termini mit endständigem Met-Ser nicht mehr acetyliert (Poleveda *et al.*, 2009). Dieser Stamm war kältesensitiv, zeigte aber keine ER-Importdefekte in Pulse-Experimenten und in einem Assay mit Ura3 fusionierten Reporterkonstrukten (Abbildung 13 und Diplomarbeit Marie-Christine Klein). Der Verlust der N-Acetylierung im  $\Delta ard1$ -Stamm hatte keinen Einfluss auf die Stabilität von Sec62p und Sbh1p (Abbildung 14 und Diplomarbeit Marie-Christine Klein). Obwohl im  $\Delta ard1$ -Stamm kein Effekt auf die Stabilität von Sec61p beobachtet wurde, habe ich trotzdem eine Mutante charakterisiert bei der das Serin an Position 2 zu Tyrosin mutiert wurde. Um auszuschließen, dass der Acetylierungsdefekt in  $\Delta ard1$ -Stamm durch die Hefe kompensiert worden war. Der Stamm *sec61S2Y* war hitze- und tunicamycin-sensitiv und zeigte leichte Defekte im posttranslationalen Import der sekretorischen Vorläuferproteine PpaF und pCPY\* bei 30°C (Abbildung 15). Dieser Phänotyp unterscheidet sich vom Phänotyp des  $\Delta ard1$ -Stammes (kältesensitiv und kein Importdefekt) und könnte auf andere Defekte zurückzuführen sein (Vgl. Abbildung 12 und Abbildung 15). Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass der  $\Delta ard1$ -Stammes adaptierte und deshalb einen veränderten

Phänotyp zeigt, wie es für eine  $\Delta sbh1\Delta sbh2$ -Mutante gezeigt werden konnte (Jiang *et al.*, 2008).

Die Mutation S2Y in Sec61p führte zu einem leichten Defekt in der ER-abhängigen Degradation des lumenalen und löslichen CPY\* (Abbildung 16). Dieser Defekt ist möglicherweise das Resultat des schwachen indirekten Importdefekts (Abbildung 15 und Abbildung 16). Interessanterweise war die Abnahme im CHX-Chase und Pulse-Chase nahezu linear über den betrachteten Zeitraum und unterscheidet sich damit von den Kinetiken der anderen beschriebenen Mutationen (Vgl. *sec61Y345H* und *sec61 $\Delta$ L7*). Dies könnte aber auch das Resultat einer verminderten Affinität des Sec61-Kanals zum Proteasom oder anderer cytoplasmatischer Interaktionspartner sein, da die Mutation S2Y dem Cytoplasma zugewandt ist. Eine andere Mutation (*sec61P50S*), die ich in der N-terminalen, cytoplasmatischen Helix eingefügt hatte, zeigte keinen Wachstumsdefekt und keine Beeinträchtigung in der Degradation von CPY\* (Abbildung 22).

Tags am N-Terminus führen zu einer Zunahme der Defekte beim Import cotranslationaler Vorläuferproteine (wie DPAPB), der Defekt im Import von Pp $\alpha$ F dagegen ändert sich nicht oder nur geringfügig (Pilon *et al.*, 1997). Deshalb spielt der N-Terminus möglicherweise eine tragende Rolle im cotranslationalen Import. Obwohl die Bindestellen des Ribosoms auf Loop 6 und Loop 8 eingegrenzt wurde, besteht die Möglichkeit, dass die N-terminale Helix auch mit dem sehr großen Ribosom interagiert und dadurch den cotranslationalen Import durch den Sec61-Kanal beeinflusst (Cheng *et al.*, 2005).

### **VIII.3 Die Mehrfachmutante *sec61EP* als Resultat des Screening in ausgewählten Bereichen**

In dieser Arbeit habe ich ein Verfahren etabliert, um ausgewählte Bereiche von Sec61p (N- und C-Terminus, Loop 7 und Loop 8) zufällig zu mutieren. Dazu habe ich neue Restriktionsschnittstellen um diesen Bereich im Sec61-ORF eingefügt, die die Aminosäuresequenz nicht beeinflussen. Für die Zufallsmutagenese habe ich Nukleotide unbalanciert eingesetzt und durch die Zugabe von MnCl<sub>2</sub> die Fehlerrate der DNA-abhängigen DNA-Polymerase erhöht (Abbildung 25). Durch die Auswahl flankierender Error-Prone-Primer wurde gewährleistet, dass nur die Bereiche von besonderem Interesse mutiert wurden. Anschließend wurden die Amplikons

geschnitten und in Plasmide ligiert, in denen *SEC61* mit demselben Enzymen geschnitten worden war.

Mutierte *Sec61*-Klone wurden auf Wachstum, Tunikamycin-Sensitivität und Degradationsdefekten untersucht und eine neue vierfach Mutante in Loop 7 identifiziert.

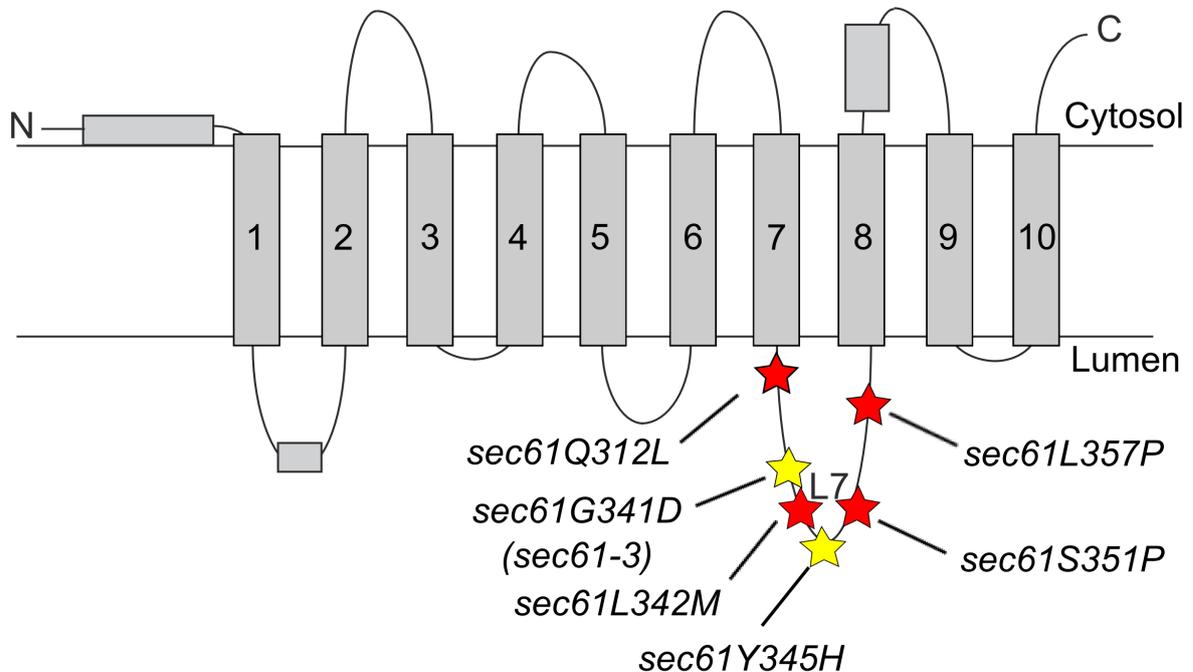


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Punktmutationen in *sec61EP*. Die Darstellung zeigt das topologische Modell von *Sec61p*. In gelb sind bekannte Referenzmutationen (*sec61Y345H* und *sec61-3*) hervorgehoben. In rot sind die vier Mutationen von *sec61EP* in Loop 7 dargestellt.

Die Mutante *sec61EP* (Q312L, L342M, S351P und L357P) war weder in Flüssigkultur noch auf Platte temperatursensitiv oder tunikamycinsensitiv (Abbildung 27). Sie zeigte Defekte im posttranslationalen Import von CPY\* bzw. PpaF und Degradationsdefekte im CHX-Chase, aber in Pulse-Chase Analysen nicht (Abbildung 29).

Die Mutation L342M liegt in direkter Nachbarschaft zu der Mutation G341D (*sec61-3*) und *sec61Y345H*. Beide Mutationen führten zu Tunikamycinsensitivität, und ERAD-Defekten (Abbildung 18 und Willer *et al.*, 2008). Verbunden sind *sec61Y345H* und *sec61EP* durch den gemeinsamen ERAD-Defekt, der aber unterschiedlichen Kinetiken folgt. Während ERAD in *sec61Y345H* besonders in den ersten 20 min gestört war, war *sec61EP* im CHX-Chase gleichbleibend über einen Zeitraum von 60 min beeinträchtigt (Vgl. Abbildung 19 und Abbildung 29). Der Unterschied von *sec61EP* zu *SEC61* lag im betrachteten Zeitraum bei ca. 20%. Außerdem sind in *sec61EP* das Serin 351 und Leucin 357 mutiert, die in der Nähe

der Mutation S353C liegen. Die Mutationen L342M, S351P und L357P sind möglicherweise kooperativ an der Ausprägung des ERAD-Phänotyps beteiligt. Beide Proline (S351P und L357P) liegen nicht unmittelbar in, aber in direkter Nachbarschaft zum helikalen Bereich inmitten von Loop 7. Ein indirekter Einfluss kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Mutation Q312L liegt direkt neben der Mutation F311Y, die keinen Translokationsphänotyp zeigt (Abbildung 22). Die Mutante *sec61M450N* aus dem rationalen Design zeigte keinen posttranslationalen Importdefekt im CHX-Chase, aber Störungen in der Degradation von CPY\* (Abbildung 23). Die Mutation liegt im hydrophoben Ring von Sec61p (Junne *et al.* 2007). Da sowohl während dem Import und Export der hydrophobe Ring passiert werden muss, stellt sich die Frage warum *sec61M450N* nur einen Exportdefekt zeigte (Abbildung 23). Die Aminosäuren T87, Q129 und N302 gehören zum polaren Cluster des lateral Gate und stehen im Kontakt zu hydrophoben Aminosäuren des Plug (L63, W65, and L66; Trueman *et al.*, 2012). Mutationen in diesen Clustern zeigen die enge Verknüpfung zwischen dem lateral Gate und dem lumenalen Gate (Trueman *et al.*, 2012). Die Mutation M450N gehört zu keinem der beiden Cluster und nimmt, nach momentanem Kenntnisstand, keinen Einfluss über diesen Prozess. Warum diese Mutation den beschriebenen Phänotyp zeigt bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zusammengefasst scheinen die beschriebenen Mutationen innerhalb eines Hotspot zu liegen, der die Aminosäuren 341-345 (Initiation des Proteinexports aus dem ER) und die Aminosäuren 352-357 (ungünstige Konformation von Loop 7 und Inhibierung der Proteasombindung) beinhaltet. Zum endgültigen Nachweis müssten die Mutationen vereinzelt und in weiterführenden Experimenten dann auf Defekte untersucht werden.

#### **VIII.4 Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise von *SEC61* durch die Mutante *sec61ΔL7***

In dieser Arbeit charakterisierte ich eine neue *sec61* Mutante ohne Loop 7. Dieser Loop ist funktional wichtig und verbindet die beiden Enden der Transmembrandomänen 7 und 8 (Abbildung 30; van den Berg *et al.*, 2004). Identifiziert habe ich die Mutante in einem Screen für intrazelluläre Akkumulation des ERAD Substrats CPY\*. Verglichen mit der Deletion von Der1, einem ER-Membranprotein, das speziell involviert ist in ERAD löslicher Proteine,

akkumulierte CPY\* nur mäßig, aber wahrnehmbar (Knop *et al.*, 1996). Durch anschließende Sequenzierung wurde der Austausch der Aminosäuren 305-371 von Sec61p durch Arginin und Glutamat festgestellt (Abbildung 30).

Die *sec61ΔL7*-Mutante war kältesensitiv und sensitiver gegenüber Tunikamycin als *sec61-32*, der stärksten ERAD-Mutante in *SEC61* (Pilon *et al.*, 1997 und 1998; Abbildung 31). Die Diabetes-verursachende Mutante *sec61Y345H* zeigte keine Wachstumsdefekte bei 20°C, 30°C und 37°C und nur einen moderaten unter dem Einfluss von Tunikamycin (Abbildung 18). Diesen Effekt habe ich in *sec61-32* und *sec61Y345H* gleichermaßen beobachtet (Fig 2B; Lloyd *et al.*, 2010). Eine Sensitivität von *sec61Y345H* gegenüber Tunicamycin wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Wheeler und Gekakis 2012). In einem UPR-Flüssigassay war das Maß der UPR-Aktivität in *sec61ΔL7* ähnlich hoch wie nach der Induktion durch Tunikamycin (Abbildung 34). Die *sec61Y345H*-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp nur eine geringe UPR-Induktion (Abbildung 34 und Abbildung 18). Weder *sec61ΔL7* noch *sec61Y345H* zeigten eine Sensitivität gegenüber EGTA, einem Calcium-Chelator bivalenter Kationen (Abbildung 32 und Abbildung 20). Im Gegensatz zu Säugerzellen spielt das Sec61p-Hefehomolog keine Rolle in der ER-Calciumhomeostase (Schäuble *et al.*, 2012).

Zellen, die ausschließlich *sec61ΔL7* exprimieren waren überlebensfähig und wachstumsfähig (Abbildung 31). Sec61ΔL7p war im Vergleich zum wildtypischen Protein nur zu 70% exprimiert (Abbildung 33). Dieser Effekt war nicht auf eine Instabilität des Proteins zurückzuführen (Abbildung 33). In Zellen, deren Expression von *SEC61* mit einem Gal-Promotor abgeschaltet werden konnte, musste der Sec61-Proteinlevel unter 50% fallen, um Translokationsdefekte zu beobachten (Abbildung 26). Die Sec61ΔL7p Menge im ER sollte daher nicht limitierend sein, und damit auch keinen Einfluss auf den ER-Import haben. In Zellen, die das mutierte *sec61ΔL7* exprimieren, akkumulierte der posttranslational transportierte PpaF (Abbildung 33) im Cytosol und pCPY\* in CHX-Chase und Pulse-Chase Experimenten (Abbildung 35). Ein Translokationsdefekt für DPAPB, einem cotranslational transportierten Modellprotein, war nicht nachweisbar (Abbildung 33).

Ich habe drei weitere ERAD-Substrate untersucht: KHN war in *sec61ΔL7* ( $t_{1/2}$ =15 min in *SEC61* und  $t_{1/2}$ =45 min in *sec61ΔL7*) stabil (Vashist und Ng, 2004.; Abbildung 36 mitte). Die Degradationsdefekte von KHN bestätigen die Ergebnisse der CPY\* Degradationsexperimente. Der Verlust von Loop 7 führte zu einer Stabilisierung

lumenaler und löslicher Proteine (Vgl. Abbildung 36 mitte und Abbildung 35). Für KWW, einem integralen Membranprotein, waren die Veränderungen in den Degradationskinetiken zwischen *SEC61* ( $t_{1/2} = 50$  min) und *sec61ΔL7* ( $t_{1/2} = 30$  min) moderater (Abbildung 36; Vashist und Ng, 2004).

Das ERAD-Substrat Deg1:Sec62p liegt in zwei Spezies vor, wobei die unglykosylierte Variante beim Verlust von Loop 7 stabilisiert wird und die glykosylierte Form in einer normalen Kinetik degradiert wird (Abbildung 36 unten). In *sec61ΔL7* ist die unglykosylierte Variante vorrangig vorhanden, in *SEC61* dagegen die glykosylierte (Vgl. *sec61ΔL7* und *SEC61* für  $t=0$  in Abbildung 36 unten). Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass Loop 7 essentiell ist für die Initiation der Degradation in Prozessen für die eine Translokation der löslichen Komponente über die ER-Membran notwendig ist (Abbildung 36). Nachfolgende Prozesse, wie das Eintreten der Transmembrandomänen in das laterale Gate werden nicht beeinflusst.

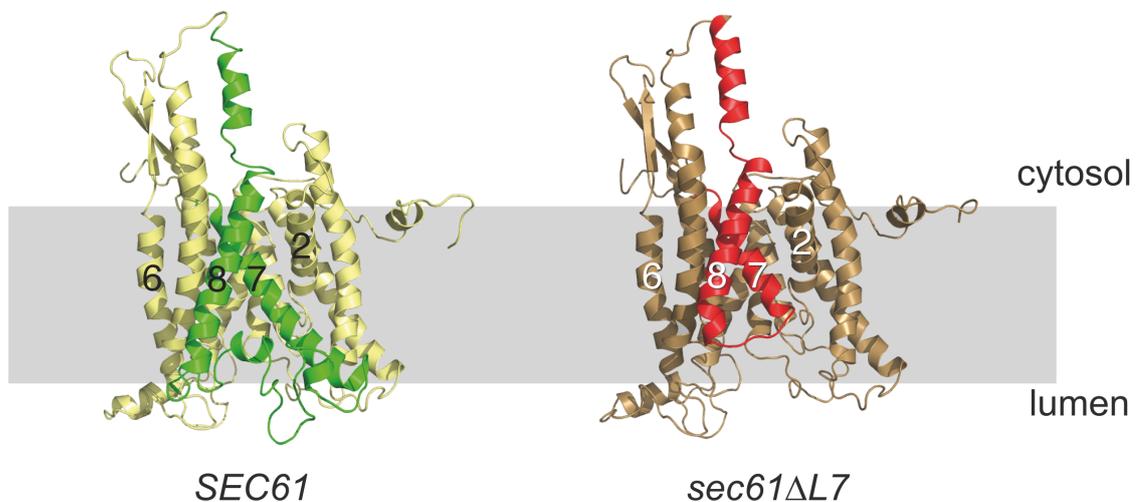


Abbildung 41: Modelling der Mutante *sec61ΔL7* (rechts) im Vergleich zu *SEC61* (links). Hervorgehoben sind die Transmembrandomänen 7 und 8 und dem verbindenden Loop 7 (rot bzw. grün). Die Lipiddoppelschicht ist durch den grau hervorgehobenen Bereich angegeben. Die Anordnung der beiden betroffenen Transmembrandomänen ändert sich kaum. Die Deletion führt zu einem Verlust der dem Lumen zugewandten Anteile der Transmembrandomänen [Modelling durchgeführt durch die AG Prof. Helms].

Modelling des *Sec61ΔL7p* zeigte Veränderungen auf der ER-luminalen Seite des *Sec61*-Kanals, aber keine Veränderungen auf der zytosolischen Seite (Abbildung 41). Das Homologie-Modell [AG Helms] und das Pulse Experiment zeigten, dass die Bindung des Ribosoms an die zytoplasmatische Seite des Kanals und der Verlust

des luminalen Ende des lateralen Gate die cotranslationale Öffnung des mutierten Sec61-Kanals nicht beeinträchtigten (Abbildung 33 und Abbildung 41). Ribosomen und Proteasomen binden an unterschiedliche Bereiche des Sec61-Kanals, aber die unveränderte Topologie auf der cytoplasmatische Seite von Sec61p erklärt die unbeeinträchtigte Bindung des Proteasoms an Sec61 $\Delta$ L7p (Ng *et al.*, 2007; Abbildung 37 [AG Kalies]).

In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation in Loop 7, S353C, die Bindung des Proteasoms beeinträchtigt (Ng *et al.*, 2007; Dissertation Marie-Luise Kaiser). Diese Mutation hält Loop 7 möglicherweise in einer ungünstigen Konformation mit negativen Auswirkungen auf die cytosolische Seite. Die Konformation von Loop 7 spielt damit eine wichtige Rolle für die Proteasomen Interaktion und die Konformation von Loop 7 kann über die Helices übermittelt werden zur cytosolischen Seite. Unsere Daten zeigen, dass der Defekt im Proteinexport nicht im Zusammenhang steht mit einer fehlerhaften Bindung des Proteasoms (Abbildung 37).

Der extrem reduzierte posttranslationale Import und der ebenfalls langsame Export in *sec61 $\Delta$ L7*-Hefen sind nur schwer zu interpretieren. Im CHX-Chase akkumuliert CPY\* im ER-Lumen, was ein Hinweis auf einen langsameren Export im Vergleich zum Import ist (Abbildung 35). Möglicherweise konkurrieren beide Prozesse um gleiche Faktoren wie BiP und Sec63p. Loop 7 ist für den cotranslationalen Import nicht essentiell. Möglicherweise ist die Anzahl an Kanälen, die mit dem Ribosom verbunden sind (~30%; Pilon *et al.*, 1998) nicht für ERAD verfügbar (Abbildung 33). Unsere Daten entsprechen einem anderen Experiment bei dem das ERAD-Substrat CPY\* überexprimiert wurde und damit die Last auf dem ER-zu-Cytosol-Weg verstärkt wurde (Ng *et al.*, 2000). Dies führte zu einer Akkumulation von Vorläuferproteinen in Abhängigkeit des *SEC61* Expressionslevels (Ng *et al.*, 2000). KHN, ein weiteres Modellprotein, das posttranslational importiert wird, akkumulierte nicht im Cytoplasma der *sec61 $\Delta$ L7*-Hefe (Abbildung 36). Möglicherweise sind die Chaperone, die für den Import von KHN verantwortlich sind andere, als für CPY\*. Für den Export von CPY\* und KHN werden dann wieder die gleichen Chaperone rekrutiert.

Eine weitere Punktmutation in Loop 7 (*sec61F311Y*) zeigte in CHX-Chase Analysen keinen Defekt (Abbildung 22). Die *sec61Y345H* Mutante zeigte keine Defekte im posttranslationalen Import ins ER und nur eine moderate

Tunikamycin-Sensitivität. Im Gegensatz zu einer weiteren Mutante in Loop 7 (*sec61F311Y*) zeigte die *sec61Y345H*-Mutante eine Verzögerung in ERAD von CPY\* (Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 22; Wheeler und Gekakis, 2012). ERAD-Verzögerungen weisen auf eine Rolle in der Initiation der Sec61-Kanalöffnung von der lumenalen Seite zum Export des ERAD-Substrats. Eine ähnliche Verzögerung ohne Veränderung der eigentlichen Kinetik wurde von Wheeler und Gekakis (2012) beobachtet. Dieser eher milde Phänotyp ist gleichzeitig vermutlich der Grund, warum die Mäuse mit dieser Mutation in einem essentiellen Gen überleben (Lloyd *et al.*, 2010). Ein verzögerter Export in Zellen mit einer hohen sekretorischen Last, wie die Zellen des Pankreas, würde zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und letztendlich zu Apoptose und Diabetes als primärer Phänotyp führen (Lloyd *et al.*, 2010). Das Faktum, dass *sec61Y345H* zu einem ERAD-Defekt in Abwesenheit eines Defekts in der Proteinbiogenese sekretorischer Proteine führt, bestätigt eine direkte Rolle von Sec61 in ERAD.

Sucrose-Gradienten Zentrifugation von Triton-X100 solubilisierten Mikrosomen zeigten, dass der Sec61-Komplex mit Sec61 $\Delta$ L7p instabil ist (Abbildung 38). Im wildtypischen Komplex bildet Sss1p eine Klemme um die Sec61p Helices, die den Komplex stabilisiert (van den Berg, 2004; Esnault *et al.*, 1994). Proteintranslokationsdefekte durch die *sec61-3* Mutation in Loop 7 können durch eine Überexpression von Sss1p unterbunden werden (Esnault *et al.*, 1994). In der Kristallstruktur des SecY-Komplex ist eine Interaktion zwischen Sss1p und Loop 7 oder den beiden verknüpften Transmembrandomänen 7 und 8 nicht zu erkennen (van den Berg *et al.*, 2004). Die Sss1p Transmembranhelix liegt gegenüber Loop 7 und bildet Kontakte zu Transmembranhelices 9, 10, 5 und 1 aus (van den Berg *et al.*, 2004; Wilkinson *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass sowohl die N-terminale  $\alpha$ -Helix von Sss1p, die auf der Membran liegt, als auch seine Transmembranhelix wichtig sind für die Assoziation mit dem Sec61-Komplex (Wilkinson *et al.*, 2010). Die Ursache für die reduzierte Affinität von Sss1p zu Sec61 $\Delta$ L7p bleibt ungeklärt.

Der Loop7 von Sec61 ist notwendig zur Bildung der freien Fraktion (Abbildung 39). Die Funktion dieser Fraktion ist momentan unbekannt, so dass eine Diskussion nur sehr schwer möglich ist. Die freie Fraktion könnte aber als eine Art Reserve fungieren oder tatsächlich einen weiteren aktiven Komplex darstellen.

Das Modelling des mutierten Proteins zeigte, dass obwohl der Plug (Helix 2a) in Sec61 $\Delta$ L7p an Ort und Stelle verweilt, das laterale Gate (Helix 2b und

Transmembranhelix 7) teilweise geöffnet ist und Helix 2b signifikant zur cytoplasmatischen Oberfläche der Membran verschiebt (Abbildung 41). Diese Verschiebung ist möglicherweise die Konsequenz des verlorenen Endes von Transmembranhelix 7, welches nicht mehr mit der Helix 2b interagieren kann und es dort arretieren kann. Diese Konformation entspricht dem Zustand nach der Insertion, wie er beobachtet wurde durch Becker und Kollegen (2009) in Cryo-Elektronen mikroskopischen Aufnahmen des Ribosoms und der naszierenden Kette verbunden mit dem Säuger Sec61-Kanal. Mein Modell schlägt vor, dass die Deletion von Loop 7 zu Veränderungen kritischer Transmembranhelices in Sec61 $\Delta$ L7p führt, was in funktionalen Defekten endet.

Das folgende Szenario erklärt meine Beobachtungen: Beim Export fehlgefalteter Proteine durch den Sec61-Kanal ins Cytosol ist Loop 7 der einzige in Frage kommende Startpunkt, weil er die einzige große Sec61-Domäne ist, die ins ER-Lumen ragt (Abbildung 41; van den Berg 2004). Wenn Loop 7 fehlt, haben der Komplex aus Chaperon und Exportsubstrat keinen Kontaktpunkt in Loop 7, von dem ausgehend das laterale Gate aus Transmembrandomäne 2 und 7 (und teilweise Loop 7) geöffnet werden kann, was dem Export aus dem ER ins Zytoplasma ermöglicht (van den Berg *et al.*, 2004; Mandon *et al.*, 2009).

Umgekehrt, beim posttranslationalen Import in das ER wird das Öffnen des Kanals vielleicht ebenfalls vom lumenalen Ende des lateralen Gates initiiert, möglicherweise durch Interaktion mit der Sec63J-Domäne und Kar2p. Die Sec63 J-Domäne und Kar2p werden benötigt für den posttranslationalen Import und ERAD in Hefen, und Sec63p ist auch beteiligt an der Qualitätskontrolle von Transmembranproteinen in Säugerzellen (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997; Kabani *et al.*, 2003; Servas und Römisch, 2013).

Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse, dass der Mechanismus des posttranslationalen Imports ins ER und des Exports von fehlgefalteten Proteinen vermutlich identisch sind und am ER-lumenalen Ende des lateralen Gate initiiert werden durch Loop 7.

## VIII.5 Übersicht Tabellen

- Tabelle 1: Die Acetylierung in *S. cerevisiae* ist sequenzspezifisch. Die Aminosäure nach dem initialen Methionin bestimmt welcher N-Acetylierungskomplex die N-Acetylierung übernimmt. Der NatA-Komplex acetyliert kleine Aminosäuren (S, A, G, T, C, V), NatB acetyliert basische Aminosäuren (E,D, N) und NatC große hydrophobe Aminosäuren (I, L, W, F). Im Falle von NatA wird zuerst das Initiator-Met durch MAP1 oder MAP2 entfernt (Polevoda *et al.*, 2009).....21
- Tabelle 2: tabellarische Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Herkunft .....34
- Tabelle 3: Übersicht der Primer die in dieser Arbeit verwendet wurden mit Angaben der Primersequenz (5'-3') und des Verwendungszwecks.....35
- Tabelle 4: Übersicht der in dieser Dissertation verwendeten primären Antikörper mit Angaben zum Wirtstier, zur Verdünnung im Western-Blot bzw. IP und der Herkunft. ....38
- Tabelle 5: Durchschnittliche Länge von Signalpeptiden und Lipoproteinsignalpeptiden in psychrophilen und mesophilen Eubakteria. Verwandte Organismen wurden innerhalb der Tabelle untergruppiert und die durchschnittliche Länge beider Signalpeptidklassen in Aminosäuren [AS] angegeben. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). .....60
- Tabelle 6: GRAVY Analyse von klassischen Signalpeptiden und Lipoprotein-Signalpeptiden. Lipoprotein-Signalpeptide und klassische Signalpeptide wurden bioinformatisch bestimmt und die Hydrophobizität beider Signalpeptidklassen nach Kyte und Doolittle (1982) berechnet. Tat-Signalpeptide wurden, wegen der geringen Anzahl an repräsentativen Proteinen, die diese Art des Signalpeptids besitzen, nicht weiter berücksichtigt nicht weiter berücksichtigt. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien) .....64
- Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung von Signalpeptiden. Die Tabelle gibt den durchschnittlichen Prozentsatz der einzelnen Aminosäuren in klassischen Signalpeptiden an. Angaben in Prozent [%]. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*.....65
- Tabelle 8: Aminosäure Komposition von Lipoprotein Signalpeptiden. Die Tabelle gibt den durchschnittlichen Prozentsatz der einzelnen Aminosäuren in Lipoproteinsignalpeptiden an. Angaben in Prozent [%].(Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa=

*Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*. .....67

Tabelle 9: Anzahl an Proteinen, die durch SignalP 3.0 (klassische Signalpeptide), Tatfind, TatP 1.0 (beide Tat-Signalpeptide) und LipoP 1.0 (Lipoproteinsignalpeptide) vorhergesagt wurden. Zur besseren Übersicht wurde die durchschnittliche Anzahl der Proteine auf je eintausend Proteine relativiert. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien, #= Anzahl). .....68

Tabelle 10: Aminosäurezusammensetzung der Transmembrandomänen. TMDs wurden durch HMMTOP vorhergesagt und die durchschnittlichen, relativen Vorkommen der zwanzig natürlichen Aminosäuren berechnet. Angaben in Prozent [%]. (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*. .....70

Tabelle 11: Ladungsverteilung um die Transmembrandomänen und Länge der TMD. Vorhergesagte TMD-Proteine wurden auf die Ladungen 15 AS vor und nach der TMD untersucht. Arg/Lys gelten als positive Ladung und Glu/Asp als negative Ladung. Zusätzlich wurde die durchschnittliche Länge der transmembranen Domänen (TMD) und relative Anzahl transmembraner Proteine (TMP) am Gesamtproteom bestimmt. Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*, Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Pa= *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas tunicata*, Ec= *Escherichia coli*, Tm= *Thermotoga maritima*. .....71

Tabelle 12: bioinformatische Analyse der Untereinheiten des Sec-Komplexes auf N-Acetylierung. Die Sec-Untereinheiten wurden mit NatAcet 2.0 und TerminiNator 2.0 auf N-Acetylierungen untersucht. Die ersten zehn Aminosäuren der Untereinheiten und die Sicherheit der Vorhersagen sind in Score (NetAcet 2.0) bzw. in Prozent (Terminator 2.0) angegeben. Ein Score  $\geq 0,5$  gilt als signifikant (Frottin *et al.*, 2006; Kiemer *et al.*, 2005). .....73

Tabelle 13: Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung. Die Sec-Untereinheiten wurden der Größe nach in einem 4-12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, ausgeschnitten und anschließend tryptisch verdaut. Für die identifizierten Proteine wurde der Protein Score, Ion Score und die Sequenz des erkannten N-terminalen Peptids angegeben. Proteine mit einem Protein Score  $>110$  und einem Ion Score  $>35$  gelten als signifikant in Bezug auf die N-Acetylierung (rot; Soromani *et al.*, 2012). .....75

Tabelle 14: Übersicht der substituierenden Punktmutationen um neue Restriktionsschnittstellen zu etablieren, die den N- oder C-Terminus, Loop 7 oder Loop 8 flankieren. ....94

Tabelle 15: Zusammenfassung der Charakterisierung der *sec61*-Mutanten dieser Arbeit. (--- = negative Veränderung ; o= keine Veränderung; x= nicht

untersucht). In die Tabelle übernommen wurden die Ergebnisse des Droptests (20°C, 30°C und 37°C), das Wachstum auf Tunicymycinplatten (0,25 und 0,50 µg/ml), die CHX- und Pulse-Chase-Analysen, sowie die Precursorakkumulation..... 112

## VIII.6 Übersicht Abbildungen

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des co- und posttranslationalen Translokationskomplexes. Der Sec61-Komplex (Sec61p, Sss1p, Sbh1; grau) assoziiert mit dem tetrameren Sec63-Komplex (grün) aus Sec62p, Sec63p, Sec66/71p und Sec72p zum Sec-Komplex. .... 10
- Abbildung 2: Der cotranslationale Import und die Rolle des trimeren Sec61p-Komplex. Das Ribosom assembliert an der mRNA und beginnt mit der Proteinsynthese (oben rechts). Sobald das Signalpeptid translatiert wurden bindet SRP (engl.: signal recognition particle) an das Signalpeptid und das Ribosom arretiert im sogenannten RNC (engl.: ribosome nascent chain complex; oben links). SRP bindet an den SR (SRP-Rezeptor) und führt den RNC zum trimeren Translokon (bestehend aus Sec61p, Sss1p und Sbh1p). Das Signalpeptid bindet an den hydrophoben Kern von Sec61p und das Ribosom nimmt die Translation wieder auf, wodurch die Translokation angetrieben wird (unten links). Nachdem das Protein vollständig ins ER-Lumen transloziert wurde, spaltet die SP I (Signalpeptidase I) das Signalpeptid ab und setzt es damit frei (unten rechts). Angelehnt an Osborne *et al.*, 2005..... 12
- Abbildung 3: Topologische Darstellung, der in dieser Arbeit verwendeten ERAD-Substrate. **A** CPY unterliegt in den unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Wegs verschiedenen Modifikationen, wodurch mehrere Zustände unterscheidbar sind (ppCPY im ER, pCPY im Golgi-Apparat und das reife CPY oder mCPY in der Vakuole). Durch die Glykosylierung von pCPY im ER-Lumen migriert dieses langsamer als ppCPY. **B** KHN (grau; links) und KWW (Mitte) sind eng miteinander verwandt und unterscheiden sich nur durch die transmembrane und cytoplasmatische Domäne von Wsc1p (blau) in KWW. Beide sind bekannte ERAD-L-Substrate. Deg1:Sec62p (rechts) ist ein ERAD-Substrat, dass zweimal die Membran durchdringt und N-terminal mit einer Degradationssequenz fusioniert ist. Sp= Signapeptid, VTS= Vakuolen Targeting Signal, gelbe Sterne= Glykosylierungsstellen, N= N-Terminus, C= C-Terminus..... 18
- Abbildung 4: Der Hefestamm KRY461 exprimiert keine genomische Kopie von *SEC61* (grau), aber das ERAD-Substrat CPY\* (*prc1-1*; blau). Das Wachstum wird gesichert durch ein Retterplasmid mit *SEC61* unter der Kontrolle eines Gal-Promotors (rot). Die Expression von *SEC61* kann durch Galaktose induziert und durch Glc reprimiert werden. Es ist somit sichergestellt, dass bei Wachstum auf Glc nur das *sec61* des transformierten Plasmids (gelb) exprimiert wird..... 34
- Abbildung 5: Flussdiagramm zum Screening nach neuen Sec61p-Mutanten in zuvor definierten Bereichen. Das Diagramm zeigt die wichtigsten Schritte beim Screening nach neuen Mutanten. Details sind dem Text zu entnehmen. .... 40
- Abbildung 6: Alignment von *E. coli* und *V. cholerae* im Vgl. zu den Psychrophilen Bakterien dieser Studie. Konservierte Aminosäuren werden in grün angezeigt und nicht konservierte rot. Die Aminosäuren des kontraktiven Rings wurden mit grau hinterlegt. Zum besseren Überblick wurden TMD und helikale Bereiche aus van den Berg *et al.* (2004) einbezogen. Ec= *Escherichia coli*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Cp= *Collwellia psycherythraea* und Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*. .... 57

- Abbildung 7: Alignment von SecY-Homologen aus *E. coli*, *V. cholerae* und den psychrophilen Bakterien *P. ingrahamii*, *C. psycherythraea* und *P. haloplanktis*. Das Alignment wurde mit ClustalW 2.0 durchgeführt und mit Jalview bearbeitet. Konservierte Bereiche werden dunkelblau angezeigt. Bakterien der CFB-Gruppe und der hyperthermophile Vertreter *T. maritima* wurden nicht berücksichtigt. Ec= *Escherichia coli*, Vc= *Vibrio cholerae*, Pin= *Psychromonas ingrahamii*, Cp= *Colwellia psycherythraea*, Ph= *Pseudoalteromonas haloplanktis*. ..... 58
- Abbildung 8: Alignment von SecY-Homologen der mesophilen und psychrophilen Vertreter der CFB-Gruppe. Das Alignment wurde mit ClustalW 2.0 durchgeführt und mit JalView bearbeitet. Konservierte Bereiche werden dunkelblau angezeigt. Fj= *Flavobacterium johnsoniae*, Pir= *Polaribacter irgensii*, Ps= *Polaribacter spec MED152*. ..... 59
- Abbildung 9: Vergleich der klassischen Signalpeptide mesophiler und psychrophiler Bacteria. Identifizierte Sequenzen wurden nach ihrer Schnittstelle ausgerichtet, einem Alignment unterzogen und mit Weblogo 2.0 zur besseren Übersicht dargestellt. Die Auftretenshäufigkeiten werden in bits und die Abstände zur Schnittstelle (-1) in Aminosäuren angegeben (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). ..... 62
- Abbildung 10: Vergleich der Signalpeptide von Lipoproteinen mesophiler und psychrophiler Bacteria. Identifizierte Sequenzen wurden nach ihrer Schnittstelle ausgerichtet, einem Alignment unterzogen und mit Weblogo 2.0 zur besseren Übersicht dargestellt. Die Auftretenshäufigkeiten werden in bits und die Abstände zur Schnittstelle (-1) in Aminosäuren angegeben (Blau= psychrophile Bakterien, schwarz= mesophile Bakterien und rot= thermophile Bakterien). ..... 63
- Abbildung 11: SDS-Page der aufgereinigten Untereinheiten des Sec-Komplexes. Die Untereinheiten wurden mit einer HA-Agarosesäule aufgereinigt, in einem 4-12% SDS-Gel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und Proteine identifiziert. Markerbanden von oben nach unten: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa und 10 kDa (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standards von Biorad). ..... 74
- Abbildung 12: Untersuchungen zur Vitalität von Hefen bei einem Verlust von Ard1p und der N-Acetylierung durch NatA. Hefezellen (BY4742,  $\Delta$ doa10,  $\Delta$ ard1) wurden in einer Verdünnung von  $10^4$  bis  $10^1$ -Zellen auf YPD-Medium aufgetropft, bei den entsprechenden Temperaturen 3d inkubiert und das Wachstum dokumentiert. .... 76
- Abbildung 13: Auswirkungen der Ard1p-Defizienz auf die Translokation. Die Stämme  $\Delta$ ard1 und BY4742 wurden mit Reporterkonstrukten für den post- bzw. cotranslationalen (CPY und PHO8) Import transformiert. Diese Reporterkonstrukte wurden mit URA3 fusioniert und synthetisieren Uracil, wenn durch einen fehlerhaften Import das Fusionskonstrukt im Cytoplasma verbleibt. Hefen mit einem Translokationsdefekt wachsen demzufolge auf Ura-d/o-Medium. .... 77
- Abbildung 14: Untersuchungen zur Stabilität von Sec61p, Sbh1p und Sec62p bei Verlust der N-Acetylierung. **A** Ganzzellextrakte wurden im Western-Blot auf Stabilität von Sec62p untersucht (links) und grafisch ausgewertet (rechts). Als

Kontrolle wurde die instabile Mutanten *sec62-1* benutzt. **B** Ganzzellextrakte wurden in einem Western Blot analysiert und gegen Sec61p und Sbh1p gefärbt. Dazu wurden gleiche Mengen Protein aufgetragen und PD1p zusätzlich als Ladekontrolle benutzt. .... 78

Abbildung 15: Vorläuferakkumulation und Wachstumsinhibition in *sec61S2Y*-Hefen. **A** gleiche Mengen Protein wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf PpaF-Akkumulation untersucht um eine Störung des Import nachzuweisen. **B** Droptest zur Überprüfung möglicher Effekte der Mutation auf die Vitalität bei verschiedenen Temperaturen und unter Einfluss von des UPR-Induktors Tunikamycin..... 80

Abbildung 16: Untersuchungen des *sec61S2Y*-Stammes auf ERAD-Defekte. **A** *sec61S2Y*-Hefen wurden mit CHX behandelt um die Translation zu inhibieren. Anschließend wurden quantitativ vergleichbare Mengen geerntet und die Hefen lysiert. Dann wurde CPY\* mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen (oben) und die relativen Mengen grafisch dargestellt (unten) **B** Hefen wurden mit radioaktivem Met/Cys markiert, geerntet, lysiert und CPY\* spezifisch gefällt. Der CPY\*-Gehalt wurde anschließend in einer denaturierenden SDS-PAGE bestimmt. **C** Colony-Blot zum Nachweis des CPY\*-Gehalt nach 10-stündiger Inkubation auf YPD-Platten mit CHX. Nach der Lyse wurde CPY\* mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. pCPY\*= cytoplasmatisches CPY\*, CPY\*= ER-residentes CPY\* ..... 82

Abbildung 17: Alignment der Sec61p-Homologe aus *E. coli* (SecY), Mensch (Sec61 $\alpha$  oder Sec61\_Hum) und *S. cerevisiae* (Sec61\_Hefe). Das Alignment erfolgte mit ClustalW 2.0. Rot hervorgehobene Aminosäuren wurden im späteren rationalen Design mutiert und die Auswirkungen der Mutation untersucht. .... 84

Abbildung 18: Vitalität und Tunikamycin-Sensitivität im Stamm *sec61Y345H*. **A** Hefen mit der *sec61Y345H* Mutation wurden bei 37°C, 30°C, mit 0,25 oder 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tunikamycin bzw. ohne Tunikamycin, und 17°C für 2 d, 3 d oder 7 d wachsen gelassen und anschließend dokumentiert. **B** Hefen (*SEC61*, *sec61Y345H*, *sec61-3*) wurden mit Reporterplasmiden (pJC31, pJC30) transformiert und auf die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase untersucht. Im Falle von pJC31 ist  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle eines UPR-Promotors, der bei induzierter UPR aktiviert wird. .... 86

Abbildung 19: Analyse von CPY\*-Degradationsdefekten im Hefestamm *sec61Y345H*. **A** Pulse-Chase-Analyse von *sec61Y345H*. Das Diagramm fasst die Resultate dreier unabhängiger Experimente zusammen. Die Werte der drei Versuche unterschieden sich im Mittel zu 7% und einer Standardabweichung von 1,8% **B** CHX-Analyse von *sec61Y345H*. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimente. pCPY\*= cytoplasmatisches CPY\*, CPY\*= ER-residentes CPY\* ..... 87

Abbildung 20: Hefen des Stamms *sec61Y345H* wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen auf eine YPD-Platte mit und ohne 5 mM EGTA getropft. Zellen mit Störungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht zwischen Cytosol und ER-Lumen zeichnen sich durch verringertes Wachstum aus. Zur Kontrolle wurde ein Pmr1p-Deletionsstamm benutzt ( $\Delta\text{pmr1}$ ). Pmr1p ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe. .... 88

Abbildung 21: Untersuchungen im Droptest und zur Precursorakkumulation in *sec61F311Y* und *sec51P50S*. **A** Hefen der zuvor erwähnten Stämmen und *SEC61* bzw. *sec61-32*-Hefen wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  Zellen in tropfenform aufgetragen und für 60 h bei 37°C, 30°C und für 7 d bei 17°C wachsen lassen und anschließend dokumentiert. **B** Die OD<sub>600</sub> von KRY461-*sec61F311Y* in der exponentiellen Phase wurden bestimmt und Ganzzellextrakte angefertigt. Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden in einer SDS-PAGE mit anschließenden Western Blot mit Antikörper gegen Sec61p und PpaF untersucht. **C** Durchführung wie B, aber mit KRY461-*sec61P50S*. ..... 89

Abbildung 22: CHX-Chase zur Degradation von CPY\* in *sec61P50S* und *sec61F311Y*. Hefezellen der exponentiellen Phase wurden zum Zeitpunkt t=0 mit CHX behandelt und die Translation inhibiert. Im Abstand von 20 min wurden Extrakte angefertigt und CPY\* bzw. Sec61p im Western-Blot detektiert. .... 90

Abbildung 23: Untersuchungen von *sec61M450N*-Hefen zur Vitalität, Precursorakkumulation und CPY\*-Degradation im CHX-Chase. **A** Hefen (*sec61M450N*) und Kontrollen wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^4$  bis  $10^1$  auf YPD-Platten getropft und für 60 min bei 37°C, 30°C und für 7 d bei 17°C wachsen lassen. **B** Auswirkung der Punktmutation auf die Translokation im zuvor erwähnten Hefestamm. Der Nachweis der PpaF-Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur erfolgte mit spezifischen Antikörpern. **C** CHX-Chase mit Extrakten zum Zeitpunkt 0, 20, 40 und 60 min und Detektion von CPY\* im Western-Blot. Sec61p dient als Ladekontrolle. .... 92

Abbildung 24: schematische Darstellung eines Topologiemodells von Sec61p mit den neuen Schnittstellen (RsrII, BspEI, AatII, BstZ17I, BsgI, BbvCI, NheI). In Rot dargestellt sind die austauschbaren Bereiche, was die Ligation von zufällig mutierten Teilabschnitten aus der EP-PCR ermöglicht. Mit \* markierte Schnittstellen liegen upstream (RsrII) bzw. downstream (NheI) des cds. .... 94

Abbildung 25: Bestimmung der maximalen Konzentration an MnCl<sub>2</sub>. Die maximale Konzentration an MnCl<sub>2</sub> wurde titriert. Für alle weiterführenden Experimente wurden 1 mM MnCl<sub>2</sub> zugegeben. Diese Konzentration gewährleistet eine hohe Mutationsrate, bei noch ausreichender Amplifikation der ausgewählten Bereiche. Ohne die Zugabe des Mutagenesepuffers erfolgt, durch den Mangel an MnCl<sub>2</sub>, keine Amplifikation. .... 95

Abbildung 26: Veränderung der Sec61p-Expression durch den Wechsel von Galaktose zu Glucose. Hefen der Stämme KRY461 und 462 wurden über Nacht in YP mit Galaktose herangezogen und zum Zeitpunkt t=0 in YPD resuspendiert. Nach 4 h wurde im Abstand von 2 h Proben entnommen, die Hefen aufgeschlossen und auf Sec61p-Gehalt und PpaF-Akkumulation untersucht. Der Stamm KRY462 entspricht dem KRY461-Stamm, besitzt aber weiterhin das genomische *SEC61*. .... 95

Abbildung 27: Droptest zur Charakterisierung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen. Hefen (*sec61ΔL7*, *SEC61*, *sec61EP*) wurden in der exponentiellen Phase auf YPD-Platten getropft und für 3 d bei den entsprechenden Temperaturen wachsen gelassen. Anschließend wurde das Wachstum dokumentiert. .... 96

- Abbildung 28: Bestimmung der Akkumulation des PpaF und der Expressionslevel von Sss1p, Sbh1p und Sec62p. Hefen wurden bei 37°C, 30°C und 20°C inkubiert, quantitativ gleiche Mengen geerntet und lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in einer SDS-PAGE aufgetragen und der Proteinlevel von Sec61p, Sec62p, Sss1p, Sbh1p und PpaF bestimmt. Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen die genannten Proteine. ....97
- Abbildung 29: CHX-Chase zur Bestimmung der CPY\*-Degradationsrate in *sec61EP*. Hefen der beiden Stämme *sec61EP* und *SEC61* wurden zu Beginn des Experiments mit CHX behandelt um die Translation zu inhibieren (t=0). Im Abstand von 20 min wurden quantitativ gleiche Mengen entnommen, Hefen lysiert und Proteine in einer SDS-PAGE und im Western-Blot auf den CPY\*-Gehalt untersucht. **B** Pulse-Chase Analyse zur Untersuchung der Degradation von CPY\* in *sec61EP*. *SEC61* und *sec61EP*-Hefen wurden mit <sup>35</sup>S-Met/Cys markiert und die Degradation von CPY\* über einen Zeitraum von 1h bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager. ....98
- Abbildung 30: Die Mutante *sec61ΔL7* wurde wegen Degradationsdefekten im Colony-Blot entdeckt. **A** Das topologische Modell von Sec61p zeigt die Lage der beiden neuen Schnittstellen AatII und BstZ17I. **B** Klone in einem ERAD-Screen gegen CPY\* wurden isoliert und erneut auf einer Platte ausgestrichen. Die Deletion von Loop 7 führt zu einer Akkumulation von CPY\*. **C** Die Mutante wurde sequenziert und die AS-Sequenz abgeleitet. Die Religation ohne das Loop 7-Insert führt zu einer Deletion der Aminosäuren 305-371 und deren Substitution durch Arg und Glu. ....100
- Abbildung 31: Vitalität von Hefen bei einem Verlust von Loop 7 in Sec61p. Hefen der Stämme *sec61ΔL7*, *SEC61* und *sec61-32*, wurden in einer Verdünnung von 10<sup>4</sup> bis 10<sup>1</sup> Zellen auf YPD getropft und nach 3 d auf Wachstum untersucht. **B** Wachstum bei 30°C durch Bestimmung der OD<sub>600</sub>. **C** Wachstum bei 30°C durch Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Kammer. ....101
- Abbildung 32: KRY461-Hefen wurden in einer Verdünnungsreihe von 10<sup>4</sup> bis 10<sup>1</sup> Zellen auf eine YPD-Platte mit und ohne 5 mM EGTA getropft und bei 30°C inkubiert. EGTA entzieht der Zelle das notwendige Ca<sup>2+</sup> und führt zu Wachstumsinhibition in Zellen deren Ca<sup>2+</sup>-Homöostase gestört ist. Ein *PMR1*-Deletionstamm (*Δpmr1*) diente der Kontrolle. ....102
- Abbildung 33: Der Verlust von Loop 7 führt zu einer Akkumulation des PpaF aber nicht von DPAPB. **A** Es wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Untereinheiten des posttranslationalen und cotranslationalen Importkomplexes (Sec61p, Sss1p, Sbh1p und Sec62p) und gegen PpaF durchgeführt. Der Verlust von Loop 7 von Sec61p zeigt sich im Western Blot durch einen Laufunterschied von 6 kDa. **B** Hefen (*sec61-32*, *sec61ΔL7* und *SEC61*) wurden radioaktiv markiert, lysiert und Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen DPAPB gefällt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Phosphorimager. pDPAPB= DPAPB-Vorläufer. ....102
- Abbildung 34: *sec61ΔL7*-Hefen sind sensitiv gegenüber Tunikamycin (TUN). **A** Hefen wurden in einer Verdünnungsreihe (10<sup>4</sup> – 10<sup>1</sup> Zellen) getropft und das Wachstum nach 6 d dokumentiert. Die Sensitivität gegenüber Tunikamycin führt

zu einer Wachstumsinhibition. **B** Hefen der genannten Stämme (*SEC61*, *sec61 $\Delta$ L7*, *sec61-3*) wurden mit Reporterplasmiden (pJC30 und pJC31) transformiert, die beide für die  $\beta$ -Galaktosidase kodieren. Im Plasmid pJC31 ist die  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des UPRE (Unfolded Protein Response Element), dass bei aktivierter UPR die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase steigert. Zur Kontrolle wurden *SEC61*-Hefen mit Tunikamycin behandelt (+TUN). ..... 103

Abbildung 35: Pulse-Chase- und CHX-Chase-Analyse der *sec61 $\Delta$ L7*-Mutante zur Bestimmung eines möglichen ERAD-Defekts. **A** Hefenstämme wurden zum Zeitpunkt t=0 für 5 min radioaktiv markiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, aufgeschlossen und CPY\* gefällt. **B** Die Translation wurde mit CHX arretiert (t=0) und zu den indizierten Zeitpunkten Proben entnommen und aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben im Western-Blot gegen CPY\* und Sec61p gefärbt und mit ImageJ quantifiziert. pCPY\*= cytoplasmatisches CPY\*, CPY\*= ER-residentes CPY\*. ..... 105

Abbildung 36: Effekt auf die Degradation von KHN, KWW und Deg1:Sec62p beim Verlust von Loop 7 von Sec61p. Hefen wurden mit Plasmiden transformiert, die eine Expression der ERAD-Substrate ermöglichen (KHN und KWW). Hefen wurden in der frühen exponentiellen Phase für 5 min mit <sup>35</sup>S-Met/Cys markiert und anschließend mit nicht radioaktivem <sup>35</sup>S-Met/Cys behandelt. Hefen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten lysiert, Proteine mit spezifischen Antikörpern gefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Banden wurden mit einem Phosphorimager detektiert (Oben und Mitte). Hefen wurden mit einem Plasmid, dass die Expression von Deg1:Sec62p ermöglicht, transformiert. Zu Beginn der exponentiellen Phase wurde CHX zugegeben um die Translation zu inhibieren und anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten Extrakte angefertigt und die Proteine in einer SDS-PAGE analysiert und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert (Unten). ..... 106

Abbildung 37: Bindung des 19S Proteasom an *SEC61*, *sec61Y345H* und *sec61 $\Delta$ L7* Proteoliposome. Mikrosomen aus dem Wildtyp oder aus *sec61*-Mutanten wurden präpariert, von Ribosomen befreit, solubilisiert und Proteine in Proteoliposomen rekonstituiert. Membranen wurden mit aufgereinigten 19S-Partikel in der Anwesenheit von 5 mM ATP inkubiert und in einem 1,8 M Sucrosegradienten für 1 h bei 200000xg zentrifugiert. Fraktionen wurden, von oben beginnend, gesammelt und in einer SDS-PAGE mit Western-Blot auf Sec61p und Rpn12p untersucht. 19S-Partikel ohne Membranen verbleiben am Boden des Gradienten. YTX69 dient als Referenz für Proteasom und Ribosom-Bindeexperimente. ..... 107

Abbildung 38: Untersuchung zur Instabilität des trimeren Komplex von *sec61 $\Delta$ L7*-Hefen. Mikrosomen von *SEC61* und *sec61 $\Delta$ L7*-Hefen wurden in TritonX solubilisiert und anschließend in einem linearen Sucrosegradienten weiter untersucht. Fraktionen 1-13 wurden abgenommen und anschließend im Western Blot auf die Untereinheiten des trimeren Komplex (Sec61p, Sss1 und Sbh1p) untersucht. Monomeres Sss1p und Sbh1p laufen in den Fraktionen 1-4, im trimeren Komplex gebundenes Sss1p und Sbh1p laufen in den Fraktionen 5-10. .... 109

Abbildung 39: Untersuchung der freien Fraktion und der Sec-Fraktion von *SEC61*- und *sec61 $\Delta$ L7*-Hefen. **A** Mikrosomen der beiden Hefestämme wurden mit

Digitonin solubilisiert und die Sec-Fraktion von der Free-Fraktion durch ConA-Fällung getrennt und im Western Blot auf Sec61p und Sec62p-Gehalt analysiert. **B** (links) Quantifizierung des Sec61p-Gehalt der Fraktionen der beiden Stämme und (rechts) Verhältnis Sec61p zu Sec62p in den jeweiligen Fraktionen..... 111

Abbildung 40: Schematische Darstellung der Punktmutationen in *sec61EP*. Die Darstellung zeigt das topologische Modell von Sec61p. In gelb sind bekannte Referenzmutationen (*sec61Y345H* und *sec61-3*) hervorgehoben. In rot sind die vier Mutationen von *sec61EP* in Loop 7 dargestellt..... 118

Abbildung 41: Modelling der Mutante *sec61ΔL7* (rechts) im Vergleich zu *SEC61* (links). Hervorgehoben sind die Transmembrandomänen 7 und 8 und dem verbindenden Loop 7 (rot bzw. grün). Die Lipiddoppelschicht ist durch den grau hervorgehobenen Bereich angegeben. Die Anordnung der beiden betroffenen Transmembrandomänen ändert sich kaum. Die Deletion führt zu einem Verlust der dem Lumen zugewandten Anteile der Transmembrandomänen [Modelling durchgeführt durch die AG Prof. Helms]..... 121

## IX. Literaturverzeichnis

- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., & Molinari, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in biochemical sciences*, 35(2), 74–82. doi:10.1016/j.tibs.2009.10.001
- Arnesen, T. (2011). Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS biology*, 9(5), e1001074. doi:10.1371/journal.pbio.1001074
- Ast, T., Cohen, G., & Schuldiner, M. (2013). A Network of Cytosolic Factors Targets SRP-Independent Proteins to the Endoplasmic Reticulum. *Cell*, 152(5), 1134–1145.
- Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science (New York, N.Y.)*, 234(4773), 179–86.
- Bachmair, A., & Varshavsky, A. (1989). The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*, 56(6), 1019–32.
- Baldwin, R. L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21), 8069–72.
- Bartel, B., Wüning, I., & Varshavsky, A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *The EMBO journal*, 9(10), 3179–89.
- Belden, W. J., & Barlowe, C. (2001). Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response. *Molecular biology of the cell*, 12(4), 957–69.
- Beltzer, J. P., Fiedler, K., Fuhrer, C., Geffen, I., Handschin, C., Wessels, H. P., & Spiess, M. (1991). Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence. *The Journal of biological chemistry*, 266(2), 973–8.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340(4), 783–95. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., & Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC bioinformatics*, 6, 167. doi:10.1186/1471-2105-6-167
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular microbiology*, 22(3), 393–404.
- Berks, B. C., Sargent, F., & Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Molecular microbiology*, 35(2), 260–74.

- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2(6), 326–32. doi:10.1038/35014014
- Blobel, G., & Sabatini, D. (1971). *Ribosome-Membrane Interaction in Eukaryotic Cells*. (L. A. Manson, Ed.) (pp. 193–195). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-3330-2
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *The Journal of cell biology*, 67(3), 852–62.
- Bretscher, M. S., & Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5126), 1280–1.
- Brodsky, J. L., Goeckeler, J., & Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9643–6.
- Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goeckeler, J. L., Kruse, K. B., & McCracken, A. A. (1999). The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *The Journal of biological chemistry*, 274(6), 3453–60.
- Carroll, S. M., & Hampton, R. Y. (2010). Usa1p is required for optimal function and regulation of the Hrd1p endoplasmic reticulum-associated degradation ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*, 285(8), 5146–56. doi:10.1074/jbc.M109.067876
- Carvalho, P., Goder, V., & Rapoport, T. A. (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*, 126(2), 361–73. doi:10.1016/j.cell.2006.05.043
- Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering*, 108(12), 2777–93. doi:10.1002/bit.23282
- Cheng, Z., Jiang, Y., Mandon, E. C., & Gilmore, R. (2005). Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation. *The Journal of cell biology*, 168(1), 67–77. doi:10.1083/jcb.200408188
- Clark, M. S., Clarke, A., Cockell, C. S., Convey, P., Detrich, H. W., Fraser, K. P. P., Johnston, I. A., et al. (2004). Antarctic genomics. *Comparative and functional genomics*, 5(3), 230–8. doi:10.1002/cfg.398
- Cole, N. B., Ellenberg, J., Song, J., DiEuliis, D., & Lippincott-Schwartz, J. (1998). Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER. *The Journal of cell biology*, 140(1), 1–15.

- Cox, J. S., & Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87(3), 391–404.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), 1188–90. doi:10.1101/gr.849004
- De Keyzer, J., Van der Does, C., Swaving, J., & Driessen, A. J. M. (2002). The F286Y mutation of PrlA4 tempers the signal sequence suppressor phenotype by reducing the SecA binding affinity. *FEBS letters*, 510(1-2), 17–21.
- De Los Rios, P., Ben-Zvi, A., Slutsky, O., Azem, A., & Goloubinoff, P. (2006). Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6166–71. doi:10.1073/pnas.0510496103
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2013). The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS microbiology reviews*. doi:10.1111/1574-6976.12020
- Deshaies, R. J., & Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, 109(6 Pt 1), 2653–64.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A., & Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, 349(6312), 806–8. doi:10.1038/349806a0
- Dilks, K., Giménez, M. I., & Pohlschröder, M. (2005). Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea. *Journal of bacteriology*, 187(23), 8104–13. doi:10.1128/JB.187.23.8104-8113.2005
- Dobson, C. M., & Ellis, R. J. (1998). Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *The EMBO journal*, 17(18), 5251–4. doi:10.1093/emboj/17.18.5251
- Dohmen, R. J., Wu, P., & Varshavsky, A. (1994). Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5151), 1273–6.
- Dowhan, W., & Bogdanov, M. (2009). Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Annual review of biochemistry*, 78, 515–40. doi:10.1146/annurev.biochem.77.060806.091251
- Driessen, A. J. M., & Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual review of biochemistry*, 77, 643–67. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.160747

- Driessen, H. P., De Jong, W. W., Tesser, G. I., & Bloemendal, H. (1985). The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC critical reviews in biochemistry*, 18(4), 281–325.
- Economou, A., & Wickner, W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*, 78(5), 835–43.
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews*, 29(1), 42–61. doi:10.1210/er.2007-0015
- Elbein, A. D. (1984). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC critical reviews in biochemistry*, 16(1), 21–49.
- Emr, S. D., Hanley-Way, S., & Silhavy, T. J. (1981). Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell*, 23(1), 79–88.
- Erdmann, F., Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Honigmann, A., Ahmad, M., Dudek, J., et al. (2011). Interaction of calmodulin with Sec61 $\alpha$  limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*, 30(1), 17–31. doi:10.1038/emboj.2010.284
- Esnault, Y., Blondel, M. O., Deshaies, R. J., Scheckman, R., & Képès, F. (1993). The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*, 12(11), 4083–93.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M. O., Schekman, R., & Képès, F. (1994). SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *The Journal of biological chemistry*, 269(44), 27478–85.
- Falcone, D., Henderson, M. P., Nieuwland, H., Coughlan, C. M., Brodsky, J. L., & Andrews, D. W. (2011). Stability and function of the Sec61 translocation complex depends on the Sss1p tail-anchor sequence. *The Biochemical journal*, 436(2), 291–303. doi:10.1042/BJ20101865
- Fields, P. A., & Somero, G. N. (1998). Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), 11476–81.
- Finger, A., Knop, M., & Wolf, D. H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *European journal of biochemistry / FEBS*, 218(2), 565–74.

- Flierman, D., Ye, Y., Dai, M., Chau, V., & Rapoport, T. A. (2003). Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), 34774–82. doi:10.1074/jbc.M303360200
- Forte, G. M. A., Pool, M. R., & Stirling, C. J. (2011). N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS biology*, 9(5), e1001073. doi:10.1371/journal.pbio.1001073
- Frottin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S., Holz, R. C., Giglione, C., & Meinel, T. (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(12), 2336–49. doi:10.1074/mcp.M600225-MCP200
- Gardner, B. M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C. M., & Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), a013169. doi:10.1101/cshperspect.a013169.
- Gauthier G, Gauthier M, Christen R: Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1995, 45:755-761.
- Gautschi, M., Just, S., Mun, A., Ross, S., Rucknagel, P., Dubaquié, Y., Ehrenhofer-Murray, A., et al. (2003). The Yeast N -Acetyltransferase NatA Is Quantitatively Anchored to the Ribosome and Interacts with Nascent Polypeptides. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7403–7414. doi:10.1128/MCB.23.20.7403-7414.2003
- Gegenheimer, P. (1990). Preparation of extracts from plants. *Methods in enzymology*, 182, 174–93.
- Gianese, G., Argos, P., & Pascarella, S. (2001). Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein engineering*, 14(3), 141–8.
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., De La Cruz, F. J., & Römisch, K. (1999). Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *The Journal of cell biology*, 147(7), 1443–56.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895–9. doi:10.1038/nature02263
- Görllich, D., & Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), 615–30.

- Gosink, J. J., Woese, C. R., & Staley, J. T. (1998). *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group and reclassification of 'Flectobacillus glomera'. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 1, 223–35.
- Guérin, R., Beauregard, P. B., Leroux, A., & Rokeach, L. A. (2009). Calnexin regulates apoptosis induced by inositol starvation in fission yeast. *PloS one*, 4(7), e6244. doi:10.1371/journal.pone.0006244
- Halachmi, D., & Eilam, Y. (1996). Elevated cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentrations and massive Ca<sup>2+</sup> accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *FEBS letters*, 392(2), 194–200.
- Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Current opinion in cell biology*, 14(4), 476–82.
- Hantke, K., & Braun, V. (1973). Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *European journal of biochemistry / FEBS*, 34(2), 284–96.
- Heckmanns, A. (2011). Screening für Mutationen in spezifischen Domänen von sec61 mit ERAD-Defekten.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., & Wolf, D. H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5282), 1725–8.
- Hole, K., Van Damme, P., Dalva, M., Aksnes, H., Glomnes, N., Varhaug, J. E., Lillehaug, J. R., et al. (2011). The human N-alpha-acetyltransferase 40 (hNaa40p/hNatD) is conserved from yeast and N-terminally acetylates histones H2A and H4. *PloS one*, 6(9), e24713. doi:10.1371/journal.pone.0024713
- Holmström, C., James, S., Neilan, B. A., White, D. C., & Kjelleberg, S. (1998). *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 4, 1205–12.
- Hsu, V. W., Yuan, L. C., Nuchtern, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Hammerling, G. J., & Klausner, R. D. (1991). A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature*, 352(6334), 441–4. doi:10.1038/352441a0
- Hwang, C.-S., Shemorry, A., & Varshavsky, A. (2010). N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 973–7. doi:10.1126/science.1183147
- Ito, K., Hirota, Y., & Akiyama, Y. (1989). Temperature-sensitive sec mutants of *Escherichia coli*: inhibition of protein export at the permissive temperature. *Journal of bacteriology*, 171(3), 1742–3.

- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., & Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nature cell biology*, 4(2), 134–9. doi:10.1038/ncb746
- Jiang, Y., Cheng, Z., Mandon, E. C., & Gilmore, R. (2008). An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *The Journal of cell biology*, 180(6), 1149–61. doi:10.1083/jcb.200707196
- Johnson, A. E., & Van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, 799–842. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.799
- Johnson, N., Powis, K., & High, S. (2012). Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*, null(null). doi:10.1016/j.bbamcr.2012.12.008
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, 12(8), 1652–1662. doi:10.1110/ps.0303703
- Jung, G., Ueno, H., & Hayashi, R. (1999). Carboxypeptidase Y: Structural Basis for Protein Sorting and Catalytic Triad. *Journal of Biochemistry*, 126(1), 1–6. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022408
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V., & Spiess, M. (2006). The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. *Molecular biology of the cell*, 17(9), 4063–8. doi:10.1091/mbc.E06-03-0200
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V., & Spiess, M. (2007). Mutations in the Sec61p channel affecting signal sequence recognition and membrane protein topology. *The Journal of biological chemistry*, 282(45), 33201–9. doi:10.1074/jbc.M707219200
- Kabani, M., Kelley, S. S., Morrow, M. W., Montgomery, D. L., Sivendran, R., Rose, M. D., Gierasch, L. M., et al. (2003). Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Molecular biology of the cell*, 14(8), 3437–48. doi:10.1091/mbc.E02-12-0847
- Kaiser, M.-L. (2013). Dissertation.
- Kalies, K.-U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kröger, H., & Römisch, K. (2005). The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *The EMBO journal*, 24(13), 2284–93. doi:10.1038/sj.emboj.7600731
- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annual review of biochemistry*, 70, 755–75. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.755

- Kiemer, L., Bendtsen, J. D., & Blom, N. (2005). NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *21*(7), 1269–70. doi:10.1093/bioinformatics/bti130
- Kienle, N., Kloepper, T. H., & Fasshauer, D. (2009). Phylogeny of the SNARE vesicle fusion machinery yields insights into the conservation of the secretory pathway in fungi. *BMC evolutionary biology*, *9*(1), 19. doi:10.1186/1471-2148-9-19
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., & Kohno, K. (2006). Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, *11*(1), 59–69. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00921.x
- Klein, M.-C. (2011). Die Rolle der N-Acetylierung in der Funktion von Sec62p.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., & Wolf, D. H. (1996). Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *The EMBO journal*, *15*(4), 753–63.
- Kocik, L., Junne, T., & Spiess, M. (2012). Orientation of Internal Signal-Anchored Sequences at the Sec61 Translocon. *Journal of molecular biology*, *424*(5), 368–78. doi:10.1016/j.jmb.2012.10.010
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, *157*(1), 105–32.
- Lakkaraju, A. K. K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J. L., Taunton, J., & Strub, K. (2012). Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Molecular biology of the cell*, *23*(14), 2712–22. doi:10.1091/mbc.E12-03-0228
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D., & Georgiou, G. (2006). The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annual review of microbiology*, *60*, 373–95. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142212
- Lee, R. J., Liu, C.-W., Harty, C., McCracken, A. A., Latterich, M., Römisch, K., DeMartino, G. N., et al. (2004). Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *The EMBO journal*, *23*(11), 2206–15. doi:10.1038/sj.emboj.7600232
- Lee, A. S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Current Opinion in Cell Biology*, *4*(2), 267–273.
- Leiros, H. K., Willassen, N. P., & Smalås, A. O. (2000). Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *European journal of biochemistry / FEBS*, *267*(4), 1039–49.
- Levine, C. G., Mitra, D., Sharma, A., Smith, C. L., & Hegde, R. S. (2005). The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. *Molecular biology of the cell*, *16*(1), 279–91. doi:10.1091/mbc.E04-06-0508

- Levy, R., Wiedmann, M., & Kreibich, G. (2001). In vitro binding of ribosomes to the beta subunit of the Sec61p protein translocation complex. *The Journal of biological chemistry*, 276(4), 2340–6. doi:10.1074/jbc.M004867200
- Li, X., & Chang, Y. H. (1995). Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12357–61.
- Lloyd, D. J., Wheeler, M. C., & Gekakis, N. (2010). A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes*, 59(2), 460–70. doi:10.2337/db08-1362
- Lodder, A. L., Lee, T. K., & Ballester, R. (1999). Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 152(4), 1487–99.
- Lomas, D. A., & Parfrey, H. (2004). Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax*, 59(6), 529–35.
- Lukacs, G. L., & Verkman, A. S. (2012). CFTR: folding, misfolding and correcting the  $\Delta F508$  conformational defect. *Trends in molecular medicine*, 18(2), 81–91. doi:10.1016/j.molmed.2011.10.003
- Mandon, E. C., Trueman, S. F., & Gilmore, R. (2009). Translocation of proteins through the Sec61 and SecYEG channels. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 501–7. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.010
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., & Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, 97(5), 553–64.
- McCracken, A. A., & Brodsky, J. L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *The Journal of cell biology*, 132(3), 291–8.
- McCracken, A. A., & Brodsky, J. L. (2005). Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival. *Current topics in microbiology and immunology*, 300, 17–40.
- Merlie, J., Sebbane, R., Tzartos, S., & Lindstrom, J. (1982). Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 257(5), 2694–2701.
- Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2008). Life at extreme limits: the anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 44–57. doi:10.1196/annals.1419.028

- Methé, B. A., Nelson, K. E., Deming, J. W., Momen, B., Melamud, E., Zhang, X., Moul, J., et al. (2005). The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10913–8. doi:10.1073/pnas.0504766102
- Miller, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., & Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 1(9), 803–17.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., & Yura, T. (1998). Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(16), 9912–20.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., & Yura, T. (2000). mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4660–5. doi:10.1073/pnas.050010197
- Mullen, J. R., Kayne, P. S., Moerschell, R. P., Tsunasawa, S., Gribskov, M., Colavito-Shepanski, M., Grunstein, M., et al. (1989). Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *The EMBO journal*, 8(7), 2067–75.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399(6734), 323–9. doi:10.1038/20601
- Ng, D. T., Brown, J. D., & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of cell biology*, 134(2), 269–78.
- Ng, D. T., Spear, E. D., & Walter, P. (2000). The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *The Journal of cell biology*, 150(1), 77–88.
- Ng, W., Sergeyenko, T., Zeng, N., Brown, J. D., & Römisch, K. (2007). Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*, 120(Pt 4), 682–91. doi:10.1242/jcs.03351
- Nichols, D. S., Nichols, P. D., & McMeekin, T. A. (1993). Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria. *Antarctic Science*, 5(02), 149–160. doi:10.1017/S0954102093000215

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & Von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering*, *10*(1), 1–6.
- Nishikawa, S., Brodsky, J. L., & Nakatsukasa, K. (2005). Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *Journal of biochemistry*, *137*(5), 551–5. doi:10.1093/jb/mvi068
- Okuda-Shimizu, Y., & Hendershot, L. M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Molecular cell*, *28*(4), 544–54. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.012
- Osborne, A. R., Rapoport, T. A., & Van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annual review of cell and developmental biology*, *21*, 529–50. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133214
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., & Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, *81*(4), 561–70.
- Park, E. C., & Szostak, J. W. (1992). ARD1 and NAT1 proteins form a complex that has N-terminal acetyltransferase activity. *The EMBO journal*, *11*(6), 2087–93.
- Paschen, W., & Mengesdorf, T. (2005). Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell calcium*, *38*(3-4), 409–15. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.019
- Petrescu, I., Lamotte-Brasseur, J., Chessa, J. P., Ntarima, P., Claeysens, M., Devreese, B., Marino, G., et al. (2000). Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. *Extremophiles: life under extreme conditions*, *4*(3), 137–44.
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D., & Schekman, R. (1998). Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Molecular biology of the cell*, *9*(12), 3455–73.
- Pilon, M., Schekman, R., & Römisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *The EMBO journal*, *16*(15), 4540–8. doi:10.1093/emboj/16.15.4540
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J., & Rapoport, T. A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*, *94*(6), 795–807.
- Plath, K., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J., & Rapoport, T. A. (2004). Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell*, *15*(1), 1–10. doi:10.1091/mbc.E03-06-0390

- Plempner, R. K., Böhmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., & Wolf, D. H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, *388*(6645), 891–5. doi:10.1038/42276
- Plempner, R. K., & Wolf, D. H. (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(7), 266–270.
- Polevoda, B., Norbeck, J., Takakura, H., Blomberg, A., & Sherman, F. (1999). Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, *18*(21), 6155–68. doi:10.1093/emboj/18.21.6155
- Polevoda, B., & Sherman, F. (2000). Nalpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *The Journal of biological chemistry*, *275*(47), 36479–82. doi:10.1074/jbc.R000023200
- Polevoda, Bogdan, Arnesen, T., & Sherman, F. (2009). A synopsis of eukaryotic Nalpha-terminal acetyltransferases: nomenclature, subunits and substrates. *BMC proceedings*, *3 Suppl 6*(Suppl 6), S2. doi:10.1186/1753-6561-3-S6-S2
- Prinz, A., Hartmann, E., & Kalies, K. U. (2000). Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological chemistry*, *381*(9-10), 1025–9. doi:10.1515/BC.2000.126
- Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, *450*(7170), 663–9. doi:10.1038/nature06384
- Ravid, T., Kreft, S. G., & Hochstrasser, M. (2006). Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *The EMBO journal*, *25*(3), 533–43. doi:10.1038/sj.emboj.7600946
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., & Evilia, C. (2013). Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, *2013*, 373275. doi:10.1155/2013/373275
- Riley, M., Staley, J. T., Danchin, A., Wang, T. Z., Brettin, T. S., Hauser, L. J., Land, M. L., et al. (2008). Genomics of an extreme psychrophile, *Psychromonas ingrahamii*. *BMC genomics*, *9*, 210. doi:10.1186/1471-2164-9-210
- Russell, N. J. (2000). Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles : life under extreme conditions*, *4*(2), 83–90.
- Römisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annual review of cell and developmental biology*, *21*, 435–56. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133250

- Römisch, K., Collie, N., Soto, N., Logue, J., Lindsay, M., Scheper, W., & Cheng, C.-H. C. (2003). Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane in cold-adapted organisms. *Journal of cell science*, *116*(Pt 14), 2875–83. doi:10.1242/jcs.00597
- Römisch, K., & Matheson, T. (2003). Cell biology in the Antarctic: studying life in the freezer. *Nature cell biology*, *5*(1), 3–6. doi:10.1038/ncb0103-3
- Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C., & Pohlschröder, M. (2002). Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Molecular microbiology*, *45*(4), 943–50.
- Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., & Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *The Journal of cell biology*, *109*(6 Pt 1), 2641–52.
- Rubenstein, E. M., Kreft, S. G., Greenblatt, W., Swanson, R., & Hochstrasser, M. (2012). Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase. *The Journal of cell biology*, *197*(6), 761–73. doi:10.1083/jcb.201203061
- Rüegsegger, U., Leber, J. H., & Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell*, *107*(1), 103–14.
- Russell, N. J. (2000). Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles: life under extreme conditions*, *4*(2), 83–90.
- Sako, T. (1991). Novel prfA alleles defective in supporting staphylokinase processing in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *173*(7), 2289–96.
- Sato, B. K., Schulz, D., Do, P. H., & Hampton, R. Y. (2009). Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase. *Molecular cell*, *34*(2), 212–22. doi:10.1016/j.molcel.2009.03.010
- Sääf, A., Wallin, E., & Von Heijne, G. (1998). Stop-transfer function of pseudo-random amino acid segments during translocation across prokaryotic and eukaryotic membranes. *European journal of biochemistry / FEBS*, *251*(3), 821–9.
- Schneider, T. D., & Stephens, R. M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic acids research*, *18*(20), 6097–100.
- Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, *404*(6779), 770–4. doi:10.1038/35008096
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., Linxweiler, J., et al. (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. *The EMBO journal*, *31*(15), 3282–96. doi:10.1038/emboj.2012.189

- Scott, D. C., & Schekman, R. (2008). Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. *The Journal of cell biology*, *181*(7), 1095–1105. doi:10.1083/jcb.200804053
- Sellek, G. A., & Chaudhuri, J. B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(6), 471–482.
- Servas, C., & Römisch, K. (2013). *Plos One*.
- Shrader, T. E., Tobias, J. W., & Varshavsky, A. (1993). The N-end rule in *Escherichia coli*: cloning and analysis of the leucyl, phenylalanyl-tRNA-protein transferase gene *aat*. *Journal of bacteriology*, *175*(14), 4364–74.
- Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, *90*(6), 1031–9.
- Smith, M. A., Clemons, W. M., DeMars, C. J., & Flower, A. M. (2005). Modeling the effects of *prl* mutations on the *Escherichia coli* SecY complex. *Journal of bacteriology*, *187*(18), 6454–65. doi:10.1128/JB.187.18.6454-6465.2005
- Soromani, C., Zeng, N., Hollemeyer, K., Heinzle, E., Klein, M.-C., Tretter, T., Seaman, M. N., et al. (2012). N-acetylation and phosphorylation of Sec complex subunits in the ER membrane. *BMC cell biology*, *13*(1), 34. doi:10.1186/1471-2121-13-34
- Tercero, J. C., Riles, L. E., & Wickner, R. B. (1992). Localized mutagenesis and evidence for post-transcriptional regulation of MAK3. A putative N-acetyltransferase required for double-stranded RNA virus propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, *267*(28), 20270–6.
- Tercero, J. C., & Wickner, R. B. (1992). MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the L-A gag NH2 terminus is necessary for virus particle assembly. *The Journal of biological chemistry*, *267*(28), 20277–81.
- Tercero, J. C., Dinman, J. D., & Wickner, R. B. (1993). Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus. *Journal of bacteriology*, *175*(10), 3192–4.
- Thomas, T., Evans, F. F., Schleheck, D., Mai-Prochnow, A., Burke, C., Penesyan, A., Dalisay, D. S., et al. (2008). Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *PloS one*, *3*(9), e3252. doi:10.1371/journal.pone.0003252
- Trueman, S. F., Mandon, E. C., & Gilmore, R. (2012). A gating motif in the translocation channel sets the hydrophobicity threshold for signal sequence function. *The Journal of cell biology*, *199*(6), 907–18. doi:10.1083/jcb.201207163.

- Tu, B. P., & Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology*, *164*(3), 341–6. doi:10.1083/jcb.200311055.
- Tusnády, G. E., & Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *Journal of molecular biology*, *283*(2), 489–506. doi:10.1006/jmbi.1998.2107.
- Tusnády, G. E., & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *17*(9), 849–50.
- Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Froderberg, L., Saaf, A., De Gier, J. W., Brunner, J., Samuelson, J. C., et al. (2001). Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO reports*, *2*(6), 524–9. doi:10.1093/embo-reports/kve108.
- Valcárcel, R., Weber, U., Jackson, D. B., Benes, V., Ansorge, W., Bohmann, D., & Mlodzik, M. (1999). Sec61beta, a subunit of the protein translocation channel, is required during Drosophila development. *Journal of cell science*, *112* ( Pt 2, 4389–96.
- Valls, L. A., Hunter, C. P., Rothman, J. H., & Stevens, T. H. (1987). Protein sorting in yeast: The localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell*, *48*(5), 887–897. doi:10.1016/0092-8674(87)90085-7.
- Van Anken, E., & Braakman, I. (n.d.). Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *40*(4), 191–228. doi:10.1080/10409230591008161.
- Van Damme, P., Arnesen, T., & Gevaert, K. (2011). Protein alpha-N-acetylation studied by N-terminomics. *The FEBS journal*, *278*(20), 3822–34. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08230.x.
- Van Damme, P., Lasa, M., Polevoda, B., Gazquez, C., Elosegui-Artola, A., Kim, D. S., De Juan-Pardo, E., et al. (2012). N-terminal acetylome analyses and functional insights of the N-terminal acetyltransferase NatB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12449–54. doi:10.1073/pnas.1210303109
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, *427*(6969), 36–44. doi:10.1038/nature02218.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *9*(2), 112–24. doi:10.1038/nrm2330.

- Varshavsky, A. (1991). Naming a targeting signal. *Cell*, 64(1), 13–5.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12142–9.
- Varshavsky, Alexander. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells*, 2(1), 13–28. doi:10.1046/j.1365-2443.1997.1020301.x.
- Vashist, S, Kim, W., Belden, W. J., Spear, E. D., Barlowe, C., & Ng, D. T. (2001). Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *The Journal of cell biology*, 155(3), 355–68. doi:10.1083/jcb.200106123.
- Vashist, Shilpa, & Ng, D. T. W. (2004). Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *The Journal of cell biology*, 165(1), 41–52. doi:10.1083/jcb.200309132.
- Vembar, S. S., & Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(12), 944–57. doi:10.1038/nrm2546.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J., & Deshaies, R. J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, 118(1), 99–110. doi:10.1016/j.cell.2004.06.014.
- Von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European journal of biochemistry / FEBS*, 133(1), 17–21.
- Von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *Journal of molecular biology*, 184(1), 99–105.
- Von Heijne, G. (1986). Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *Journal of molecular biology*, 192(2), 287–90.
- Von Heijne, G. (1989). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein engineering*, 2(7), 531–4.
- Von Heijne, G. (1990). Protein targeting signals. *Current opinion in cell biology*, 2(4), 604–8.
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), 1081–6. doi:10.1126/science.1209038.
- Walter, P., & Johnson, A. E. (1994). Signal Sequence Recognition and Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Annual Review of Cell Biology*, 10(1), 87–119. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.000511.

- Wang, C., Xi, J., Begley, T. P., & Nicholson, L. K. (2001). Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. *Nature structural biology*, 8(1), 47–51. doi:10.1038/83041.
- Wang, X., Bogdanov, M., & Dowhan, W. (2002). Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. *The EMBO journal*, 21(21), 5673–81.
- Wheeler, M. C., & Gekakis, N. (2012). Defective ER associated degradation of a model luminal substrate in yeast carrying a mutation in the 4th ER luminal loop of Sec61p. *Biochemical and biophysical research communications*, 427(4), 768–73. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.136.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., et al. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 384(6608), 432–8. doi:10.1038/384432a0.
- Wilkinson, B. M., Esnault, Y., Craven, R. A., Skiba, F., Fieschi, J., K'epès, F., & Stirling, C. J. (1997). Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *The EMBO journal*, 16(15), 4549–59. doi:10.1093/emboj/16.15.4549.
- Wilkinson, B. M., Critchley, A. J., & Stirling, C. J. (1996). Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *The Journal of biological chemistry*, 271(41), 25590–7.
- Willer, M., Forte, G. M. A., & Stirling, C. J. (2008a). Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. *The Journal of biological chemistry*, 283(49), 33883–8. doi:10.1074/jbc.M803054200.
- Wittke, S., Dünwald, M., & Johnsson, N. (2000). Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Molecular biology of the cell*, 11(11), 3859–71.
- Wittke, S., Dünwald, M., Albertsen, M., & 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*. *Molecular biology of the cell*, 13(7), 2223–32. doi:10.1091/mbc.01-10-0518.
- Wolf, D. H., & Fink, G. R. (1975). Proteinase C (carboxypeptidase Y) mutant of yeast. *J. Bacteriol.*, 123(3), 1150–1156.
- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., & Kohno, K. (2011). Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science (New York, N. Y.)*, 331(6017), 586–9. doi:10.1126/science.1197142.

- Ye, Y., Meyer, H. H., & Rapoport, T. A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *The Journal of cell biology*, 162(1), 71–84. doi:10.1083/jcb.200302169.
- Zimmer, J., Nam, Y., & Rapoport, T. A. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*, 455(7215), 936–43. doi:10.1038/nature07335.
- Zito, E., Chin, K.-T., Blais, J., Harding, H. P., & Ron, D. (2010). ERO1-beta, a pancreas-specific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis. *The Journal of cell biology*, 188(6), 821–32. doi:10.1083/jcb.200911086.

## Referenzsequenz zu Sec61 in pRS315:

```

2 AGCTTGCTATAAGCT AGAATGTATTGAATG TATTCATCTTCCTTA
1 S L L * A R M Y * M Y S S S L
47 CATCTCTCTCTCTCT TCACACTTGTACCC GGCGCGGCAGCGCTC
16 H L S L S S H L L P G A A A L
92 CAGATTTTTCGCTTT ACGTGTTCCTCTCTCA TTCTCTTTGTCGTTG
31 Q I F R F T C S L S F S L S F
137 TCTCTCATTTCTTTCT TTCGGCAACTTTTGC CAAACAACAAGCATA
46 S L I L S F G N F C Q T T S I
182 ATTCCTGCCTTGAAT TGGCGTTACGGTGGT AACGTAGTTTAGTGT
61 I P A L N W R Y G G N V V * C
227 AAAAAACAACAAATCA AGGACCTCACTTTTGC ACCCTCCATCCTCAA
76 K N N K S R T S L C T L H P Q
272 TTCCTGCTCCCAATC GGAAACTTCAGCGGC CTCCGAACAACTT
91 F L L P I G N F S G L R T N L
317 TTTTTCAGTCCCTCAA TTCAACCTCACTCCA TTTACTACAAGTTT
106 F F S P Q F N L T P F T T R F
362 AGTTGGTGAAAGCAA AAGAAAAAACATAG TTAAATATAGTAGCA
121 S W * K Q K K K T * L N I V A
407 AGTAGAAAAACTGAC ACCGGTCCGCGCTTT ACTTTGAAAATGTCC
136 S R K T D T G P R F T L K M S
452 TCCAACCGTGTCTA GACTTGTTTAAGCCA TTTGAATCTTTCCTG
151 S N R V L D L F K P F E S F L
497 CCGGAAGTGATTGCT CCAGAAAGGAAGGTT CCATACAACCAGAAA
166 P E V I A P E R K V P Y N Q K
542 CTTATCTGGACAGGC GTTTCCTCTACTGATC TTTTTGATTCTGGGC
181 L I W T G V S L L I F L I L G
587 CAGATTCCGCTGTAC GGGATCGTGTCCAGT GAGACTCCGAGTCC
196 Q I P L Y G I V S S E T S D P
632 CTGTACTGGCTACGT GCCATGCTGGCCTCC AACCGTGGTACTTTA
211 L Y W L R A M L A S N R G T L
677 CTGGAATTGGGTGTT TCGCCCATCATCACT TCATCTATGATTTTC
226 L E L G V S P I I T S S M I F
722 CAATTTTGCAGGGT ACTCAGCTTTTACAA ATCAGACCTGAGAGC
241 Q F L Q G T Q L L Q I R P E S
767 AAGCAGGACAGAGAG CTGTTCCAAATTGCT CAAAAGGTGTGCGCT
256 K Q D R E L F Q I A Q K V C A
812 ATTATTTCTGATCTTG GGCCAAGCCCTTGTG GTCGTCATGACAGGT
271 I I L I L G Q A L V V V M T G
857 AACTACGGTGCCCCT TCGGACCTCGGATTG CCCATCTGTTTGTG
286 N Y G A P S D L G L P I C L L
902 TTAATCTTTCAATTG ATGTTTGCATCGCTG ATTGTGATGTTATTA
301 L I F Q L M F A S L I V M L L
947 GACGAATTGCTATCT AAGGGTTACGGCTTG GGTTCGGTATTTCT
316 D E L L S K G Y G L G S G I S
992 CTGTTACGGCAACC AATATTGCCGAACAA ATTTTCTGGAGAGCG
331 L F T A T N I A E Q I F W R A
1037 TTTGCTCCTACTACA GTCAATTCCGGTTCGT GGTAAGGAGTTCGAA
346 F A P T T V N S G R G K E F E
1082 GGTGCTGTGATTGCC TTTTTCATCTTTTGG GCTGTCAGAAAGGAC
361 G A V I A F F H L L A V R K D
1127 AAGAAAAGAGCCCTT GTCGAGGCCTTTTAC CGTACCAATCTACCT
376 K K R A L V E A F Y R T N L P
1172 AATATGTTCCAAGTG TTGATGACCGTGGCC ATCTTCCTCTTTGTT
391 N M F Q V L M T V A I F L F V
1217 TTATATTTACAAGGC TTCCGTTACGAATTG CCCATCAGGTCAACC
406 L Y L Q G F R Y E L P I R S T
1262 AAAGTGAGAGGTCAA ATTGGTATCTACCCC ATCAAACCTTTTTAT
421 K V R G Q I G I Y P I K L F Y
1307 ACTTCCAACACCCCA ATCATGTTGCAGAGT GCATTGACTTCTAAC
436 T S N T P I M L Q S A L T S N
1352 ATTTTCTTGATCTCT CAAATCCTTTTCCAG AAATACCCAACCAAT

```

451 I F L I S Q I L F Q K Y P T N  
1397 CCATTGATTCGTTTG ATCGGTGTTTGGGGT ATCAGGCCGGGCACC  
466 P L I R L I G V W G I R P G T  
1442 CAGGGCCCTCAAATG GCCTTGAGCGGGTTG GCCTACTACATCCAA  
481 Q G P Q M A L S G L A Y Y I Q  
1487 CCATTAATGTCTTTA TCCGAAGCTCTTCTG GACCCTATCAAGACC  
496 P L M S L S E A L L D P I K T  
1532 ATCGTATACATCACA TTTGTTCTTGTTTCA TGCGCAGTATTTTCC  
511 I V Y I T F V L G S C A V F S  
1577 AAGACATGGATCGAA ATCTCCGGCACTTCC CCACGTGACATTGCC  
526 K T W I E I S G T S P R D I A  
1622 AAACAATCAAAGAT CAAGGCATGGTCATT AACGGTAAGAGAGAA  
541 K Q F K D Q G M V I N G K R E  
1667 ACCTCCATTTACAGA GAATTGAAGAAGATC ATTCCAACCTGCTGCT  
556 T S I Y R E L K K I I P T A A  
1712 GCTTTCGGCGGTGCT ACCATCGGTGCTCTT TCTGTTGGCTCCGAC  
571 A F G G A T I G A L S V G S D  
1757 CTACTAGGTACTTTA GGTTCGGGGCATCC ATTTTGATGGCTACT  
586 L L G T L G S G A S I L M A T  
1802 ACCACCATCTACGGC TACTACGAAGCTGCC GCCAAGGAAGGTGGG  
601 T T I Y G Y Y E A A A K E G G  
1847 TTTACTAAGAACCCTC GTTCCAGGATTTTCT GATTTGATGTGAATA  
616 F T K N L V P G F S D L M \* I  
1892 TAAAATGAAAATAAT ATCCAAAGAAAAAAA AAATCGCATTTAGCC  
631 \* N E N N I Q R K K K S H L A  
1937 ACACCCCTCCCTCTA TTTTTTTATTTTGT ACCATAGTTTTATCA  
646 T P L P L F F Y F V T I V L S  
1982 ACGCCTTCTTACACC TGTATAGAGCTAAAT AACTATATATATGTA  
661 T P S Y T C I E L N N Y I Y V  
2027 TGCGCAAATAATTCC TAGAAAATCGTCGAT TTTTATAAATTCTAA  
676 C A N N S \* K I V D F Y K F \*  
2072 CCGCCGATTAACAAT ATCATAACGCGATCTA AATTTATAATAGGCG  
691 P P I N N I I R D L N L \* \* A  
2117 TGAAGCAAAGGAAGT TGATAAAAAAAAAAGT AAAGAACTCCTCATA  
706 \* S K G S \* \* K K S K E L L I  
2162 GGGGGCTCGAACCCC TGACATTTCCGGTATC CTTGCTTAAGCAAAT  
721 G G S N P \* H F G I L A \* A N  
2207 GCG  
736 A

## *Danksagung*

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Römisch für die letzten Jahre und die Möglichkeit an einem komplexen und interessanten Thema zu arbeiten. Vielen Dank für die Möglichkeit mich zu entwickeln und selbstständig wissenschaftlich zu arbeiten. Danke für die Einführung in die proteinbiochemische Arbeitsweise und vielen Dank für Ihre Betreuung.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Zimmermann für die Begutachtung meiner Dissertation. Vielen Dank, dass Sie sich bereit erklärt haben als mein wissenschaftlicher Begleiter zu fungieren.

Ich bedanke mich bei der AG Schmitt, AG Giffhorn (insbesondere Prof. Kohring), AG Schekman, AG Brown und AG Ng für die Bereitstellung verschiedenster essentieller Dinge, wie Antikörper, Plasmide und Wissen.

Ich möchte mich bedanken bei der AG Römisch 1.0 (M.-L. Kaiser und C. Servas) für die letzten Jahre der Zusammenarbeit. Viel Glück für die Zukunft.

Ich möchte mich bedanken bei der AG Römisch 2.0 (F. Elia, F. Pereira, A. Molinaro) für die kurze, aber unglaublich freundliche Unterstützung in den letzten Zügen meiner Arbeit und für die vielen gemeinschaftlichen Abende. Ich wünsche euch ganz viel Glück und Muse für zukünftige Ereignisse!

Ich danke auch der Arbeitsgruppe von Prof. Helms und Özlem Ulucan für das Homologie-Modell und für die Hilfe bei der Interpretation der Daten. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der AG Kalies für die freundliche telefonische Unterstützung und die Durchführung der Ribosomenbindexperimente. Vielen Dank an die AG Heinzle und Dr. Hollemeyer für die technische Unterstützung während der MALDI-Analysen und für die Hilfe bei der Auswertung.

Ich danke A. Schumacher und C. Jalal für das Korrekturlesen meiner Arbeit, für die vielen Verbesserungsvorschläge, Durchhalteparolen, Frühstücke und Konzerte während dieser anstrengenden Zeit. Ich danke natürlich auch meiner Nachbarin, H. Löx, für so manchen Abend mit Essen und Wein. Danke für die nette Gesellschaft. A. Gress, R. Weyand, T. Will und A. Zapp, danke ich für die gemeinsame Zeit in der Bioinformatik. Leider war sie viel zu kurz. Ich danke allen anderen Freunden für die Unterstützung und den Zuspruch während den letzten Jahren.

Ich danke meinen ehemaligen Studenten S. Diegeler, A. Heckmanns und M.-C. Klein für die erheiternden Momente im Labor, die die vielen frustrierenden Momente egalisiert haben. Danke an J. Z. Gonzales für die administrative Unterstützung und freundlichen Unterhaltungen. Vielen Dank ans technische Management (B. Hasper und C. Clemens). Euch wünsche ich viel Glück, Geduld und Erfolg für die kommenden Tage.

Ich danke meiner Mutter, meinem Vater, meinem Bruder, meinem Opa und meiner Oma für den bedingungslosen Rückhalt während den zeitaufwendigen und stressigen Jahren. Ich danke Lena Falk für die Motivation, den Rückhalt und die Geduld während meiner Promotion. Ohne deine Unterstützung wäre diese Promotion definitiv nicht möglich gewesen.

Aus dieser Dissertation sind folgende Publikationen entstanden:

**Tretter, T.**, Pereira, F. P., Ulucan, O., Helms, V., Allan, S., Kalies, K.-U. und Römisch, K. (2013). ERAD and protein import defects in a sec61 mutant lacking ER-lumenal loop 7. *BMC cell biology*.

Soromani, C., Zeng, N., Hollemeyer, K., Heinzle, E., Klein, M.-C., **Tretter, T.**, Seaman, M. N., und Römisch, K. (2012). N-acetylation and phosphorylation of Sec complex subunits in the ER membrane. *BMC cell biology*, 13(1), 34. doi:10.1186/1471-2121-13-34